

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Spektroskopische Charakterisierung der grün-
absorbierenden Kanalrhodopsin-Chimäre ReaChR**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

von

Dipl. Chem. Benjamin Sören Krause

Präsidentin: Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter Hegemann

2. Prof. Dr. Franz J. Bartl

3. Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Datum der Einreichung: 15. November 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Februar 2018

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Kanalrhodopsine (ChRs) sind lichtgesteuerte Ionenkanäle, welche nach Absorption eines Photons durch den Retinal-Cofaktor einen passiven Ionentransport über die Zellmembran katalysieren. Im Zuge von optogenetischen Anwendungen wird diese lichtgetriebene Reaktion für die Beeinflussung der Ionenhomöostase von verschiedenen Zelltypen ausgenutzt.

Die vorgestellte Arbeit stellt die erste umfassende spektroskopische Charakterisierung eines grün-absorbierenden ChR, dem so genannten ReaChR, dar. ReaChR ist ein vielverwendetes optogenetisches Werkzeug, weil es neben großen Photoströmen auch gute Expressionseigenschaften in einer Vielzahl von verschiedenen Wirtssystemen besitzt.

Für die spektroskopische Charakterisierung wurde ein HEK293T-basiertes Expressionssystem und ein Aufreinigungsprotokoll etabliert, mit welchem gute Ausbeuten und hohe Reinheiten von rekombinantem Protein erzielt werden konnten. ReaChR zeigte unter physiologischen Bedingungen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 527$ nm. Damit ist es im Vergleich zu dem am besten untersuchten Kanalrhodopsin ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR2) um knapp 60 nm in den längerwelligen Spektralbereich verschoben. In Abhängigkeit vom pH-Wert erfährt ReaChR eine protochrome Verschiebung von insgesamt 35 nm. Die spektrale Lage und die starke Protochromie wurden anteilig dem Protonierungszustand des Gegenions E163 ($pK_s \sim 7.3$) zugeschrieben.

Nach grüner Laseranregung durchläuft ReaChR eine Reaktionskaskade aus fünf sequentiellen Photointermediaten (K_{app} , L_{app} , M_{app} , N_{app} & O_{app}), wobei die Population und die Übergangskinetiken der einzelnen Zustände vom pH-Wert beeinflusst werden. Der frühe K_{app} -Zustand ist gegenüber dem Dunkelzustand um 33 nm bathochrom verschoben und weist einen stark verdrehten Chromophor auf. FTIR-Messungen einiger Mutanten suggerierten, dass die Distorsion des Cofaktors in K_{app} durch eine Wechselwirkung des Gegenions E163 mit der protonierten Retinal Schiffschen Base (RSB) verursacht wird. Im nachfolgenden, für CrChR2 unbekannten L_{app} -Intermediat befindet sich der Cofaktor in einer relaxierten Konfiguration und das Absorptionsmaximum schiebt nach $\lambda_{\max} = 495$ nm. Die Aufhebung der Distorsion der prosthetischen Gruppe im $K_{app} \rightarrow L_{app}$ -Übergang geht mit großen Konformations- bzw. Hydratisierungsänderungen einher, welche mit der Kanal(vor)öffnung in ReaChR gedeutet wurden. Die Deprotonierung der RSB erfolgt im $L_{app} \rightarrow M_{app}$ -Übergang und das abstrahierte Proton wird von dem primären Protonakzeptor D293 aufgenommen. Im M-Zustand spaltet sich der Photozyklus in einen Haupt- ($M_{app} \rightarrow N_{app} \rightarrow O_{app} \rightarrow D_{app}$) und einen Seitenweg ($M_{app} \rightarrow D_{app}$) auf. Das im $M_{app} \rightarrow N_{app}$ -Übergang gebildete reprotonierte N_{app} -Intermediat ($\lambda_{\max} = 530$ nm) ist im WT bei pH 7.4 gegenüber dem Dunkelzustand spektral nicht verschoben und wird demzufolge größtenteils überlagert. Höchstwahrscheinlich fungiert ein Wassermolekül der geöffneten Kanalpore als Protondonor der RSB.

Im Gegensatz zur grünen Photoaktivierung wird bei Laseranregung in der blauen bzw. roten Flanke des Absorptionsmaximums von ReaChR, neben einer schnelleren bzw. langsameren Photozyklusprogression, auch eine unterschiedliche spektrale Komposition beobachtet. In Kombination mit weiteren Belichtungs- und Retinal-Extraktionsexperimenten wurde ein Zwei-Zyklen-Modell postuliert, in welchem zwei im Gleichgewicht stehende Dunkelzustände

(D & D') zwei Photozyklen (*anti*- & *syn*-Zyklus) mit unterschiedlichen Durchlaufzeiten und spektralen Intermediaten populieren. Die Equilibrierung zwischen D und D' wird von der Anregungswellenlänge, dem pH-Wert sowie der Asparaginsäure D196 (DC-Paar) beeinflusst.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die IR-aktive, unnatürliche Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) mittels Stopp-Codon-Suppression an mehreren Positionen innerhalb der vermuteten ionenleitenden Kanalpore in ReaChR inkorporiert und Hydratisierungsdynamiken während des Photozyklus *via* FTIR beobachtet. Während der extrazelluläre Halbkanal in ReaChR im Dunkel- und im offenen Zustand gleichermaßen hydratisiert vorliegt, sind in der Region zwischen Innerem und Zentralem Tor große Solvatisierungsänderungen zu beobachten. Es wurde vermutet, dass sich infolge der Kanalschließung und der Reetablierung beider räumlichen Konstriktionen die Wasserphase des Ionentransportwegs verlagert und eine nur noch partiell hydratisierte Kavität im Dunkelzustand zurücklässt. Mutationen des Inneren Tors beeinflussten die Hydratisierungsänderungen während des Photozyklus.

Im Rahmen der Arbeit wurde zum ersten Mal der erfolgreiche *in-vivo*-Einbau von artifiziellen Aminosäuren in mikrobiellen Rhodopsinen und deren schwingungsspektroskopische Analyse demonstriert. Die Methode bietet aufgrund ihrer hohen Ortsauflösung und der spektralen Separation der Reportergruppe ($\nu_{\text{max}} \sim 2100 \text{ cm}^{-1}$) von endogenen Proteinschwingungen ($\nu < 1800 \text{ cm}^{-1}$) ein großes Potential für die Studie von Mikroumgebungen innerhalb komplexer Proteinensembles.

Abstract

Channelrhodopsins (ChRs) are light-gated ion channels. Upon absorption of a photon, the retinal chromophore isomerizes and drives conformational changes within the protein, which lead to a passive ion transport across the cell membrane. This capability is used for optogenetic applications to manipulate ionic homeostasis of different cell types and entire organisms.

This study represents the first profound spectroscopic characterization of a green-absorbing ChR. ReaChR is frequently used as an optogenetic tool due to its large photocurrents and good expression in several hosts.

Within the work an expression and purification protocol based on HEK293T cells was established, which yields good amounts of highly pure protein. In recombinant form, ReaChR absorbs at $\lambda_{\max} = 527$ nm at pH 7.4, approx. 60 nm red-shifted in comparison to the best-characterized ChR2 from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR2). The absorption maximum shifts over 35 nm when pH is changed. The strong protochromic shift and the absorption maximum are caused partially by the protonation state of the counterion E163 ($pK_a \sim 7.3$).

Upon green light illumination, ReaChR undergoes a reaction cascade of five sequential photointermediates (K_{app} , L_{app} , M_{app} , N_{app} & O_{app}). Their population and transition kinetics are influenced by the applied pH. The early K_{app} intermediate is shifted 33 nm towards longer wavelengths, which was explained by a twisted chromophore structure induced by a strong interaction with the counterion E163. In the following L_{app} state, which was not observed for CrChR2, the cofactor strain is relieved and the absorption maximum shifts to $\lambda_{\max} = 495$ nm. Chromophore relaxation is accompanied by large conformational changes, which might correlate with channel pre-gating. Deprotonation of the retinal Schiff base (RSB) occurs in $L_{app} \rightarrow M_{app}$ and the counterion D293 was identified as the primary proton acceptor. Subsequently, M diverges into a main ($M_{app} \rightarrow N_{app} \rightarrow O_{app} \rightarrow D_{app}$) and a side path ($M_{app} \rightarrow D_{app}$). The reprotonated N_{app} ($\lambda_{\max} = 530$ nm) is overlapped under physiological conditions by the dark state absorption, thus not seen in transient UV-vis measurements of the WT. A water molecule of the ion-conducting pore might serve as the proton donor for the RSB.

In contrast to green illumination, excitation with blue and red light lead to faster and slower progressing photoreactions, respectively. Moreover, no corresponding L-state was observed upon blue illumination. In conjunction with kinetic and steady state UV-vis measurements as well as retinal extraction, we propose a two-photocycle (*anti*- & *syn*-cycle) model based on two dark states (D & D'). Photoactivation of each dark states elicits a separate photocycle with different intermediates and turnover kinetics. The equilibrium between D and D' is influenced by the excitation wavelength, pH and the DC-pair residue D196.

The second part of the work deals with the incorporation of the IR-active, unnatural amino acid *p*-azido-L-phenylalanine (azF) into the putative ion pore of ReaChR. azF was site-specifically introduced at several sites by stop codon suppression, and recombinant mutants were investigated by FTIR. The data reveal that the extracellular half channel remains similarly hydrated in the dark and in the conducting state, whereas the interface between inner and central gate undergoes large hydration changes. I propose that during channel closing and

re-formation of the sterical constrictions, the water-filled ion channel collapses and water migrates to the intracellular side, leaving a partial hydrated inner gate structure. Furthermore, mutations of the inner gate affect the residual hydration level in this protein compartment.

To my knowledge, this work presents the first report of the successful *in-vivo* incorporation of an artificial amino acid into a microbial rhodopsin and its subsequent spectroscopic investigation. The applied methodology is superior over conventional FTIR methods in terms of spatial resolution and allows for simultaneous detection of dynamics of the IR-reporter ($\nu_{\text{max}} \sim 2100 \text{ cm}^{-1}$) as well as endogenous protein oscillations ($\nu < 1800 \text{ cm}^{-1}$). The findings highlight the enormous potential to study microenvironments within complex protein ensembles.

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Wietek, J., Broser, M., **Krause, B.S.** & Hegemann, P., 2016. Identification of a Natural Green Light Absorbing Chloride Conducting Channelrhodopsin from *Proteomonas sulcata*, *J. Biol. Chem.*, 291(8), pp.4121-4127.

Krause, B.S.*, Grimm, C.*, Kaufmann, J.C.D., Schneider, F., Sakmar, T.P., Bartl, F.J. & Hegemann, P., 2017. Complex Photochemistry within the Green-Absorbing Channelrhodopsin ReaChR, *Biophys. J.*, 112(6), pp.1166-1175.

Kaufmann, J.C.D.*, **Krause, B.S.***, Grimm, C., Ritter, E., Hegemann, P. & Bartl, F.J., 2017. Proton transfer reactions in the red light-activatable channelrhodopsin variant ReaChR and their relevance for its function, *J. Biol. Chem.*, 292(34), pp.14205-14216.

Hontani, Y., Broser, M., Silapetere, A., **Krause, B.S.**, Hegemann, P. & Kennis, J.T.M., 2017. The femtosecond-to-second photochemistry of red-shifted fast-closing anion channelrhodopsin PsACR1, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(45), pp.30402-30409.

*Geteilte Erstautorenschaft

Teile der Arbeit sind für die Veröffentlichung geplant:

Kaufmann, J.C.D., **Krause, B.S.**, Ritter, E., Hegemann, P. & Bartl, F.J., The protonation state of the counter-ions in Channelrhodopsin mediates energy transfer from chromophore to protein and modulates *syn-anti* isomerization of the retinal cofactor.

Krause, B.S., Kaufmann, J.C.D., Kuhne, J., Vieroock, J.T.T., Huber, T., Sakmar, T.P., Gerwert, K., Bartl, F.J. & Hegemann, P., Tracking pore hydration within channelrhodopsin by site-directed infrared-active azido probes.

Poster- und Vortragspräsentationen

Krause, B.S., Hegemann, P., Huber, T. & Sakmar, T.P., 2014. Site-specific tagging of channelrhodopsins with genetically-encoded azido groups, *58th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Francisco, Kalifornien, Vereinigten Staaten von Amerika, **Poster**.

Krause, B.S., Kaufmann, J.C.D., Bartl, F.J., Huber, T., Sakmar, T.P., & Hegemann, P., 2014. Spectroscopic investigation of the channelrhodopsin chimera ReaChR, *Channelrhodopsin et al. – Optogenetic Tools and Application*, Würzburg, Deutschland, **Poster**.

Krause, B.S., 2015. Unique chromophore arrangements and multiple pH-effects within the photocycle of ReaChR, *International Chemical Congress of the Pacific Basin Societies*, Honolulu, Hawaii, Vereinigten Staaten von Amerika, **Vortrag**.

Krause, B.S., Kaufmann, J.C.D., Grimm, C., Bartl, F.J. & Hegemann, P., 2015. Photocycle and proton transfer in the red-activatable Channelrhodopsin ReaChR, *International Chemical Congress of the Pacific Basin Societies*, Honolulu, Hawaii, Vereinigten Staaten von Amerika, **Poster**.

Krause, B.S., Kaufmann, J.C.D., Kuhne, J., Vieroock, J.T.T., Huber, T., Sakmar, T.P., Gerwert, K., Bartl, F.J. & Hegemann, P., 2016. Tracking pore hydration within the red-activatable channelrhodopsin ReaChR by site-directed labeling with infrared-active azido probes, *17th International Conference on Retinal Proteins*, Potsdam, Deutschland, **Poster**.

Krause, B.S., Kaufmann, J.C.D., Kuhne, J., Vieroock, J.T.T., Huber, T., Sakmar, T.P., Gerwert, K., Bartl, F.J. & Hegemann, P., 2017. Tracking pore hydration within the red-activatable channelrhodopsin ReaChR by site-directed labeling with infrared-active azido probes, *61st Annual Meeting of the Biophysical Society*, New Orleans, Louisiana, Vereinigten Staaten von Amerika, **Poster**.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Name
ACR	anionenleitendes Kanalrhodopsin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
AS	Aminosäure
ASR	Sensorisches Rhodopsin aus <i>Anabaena</i> sp.
ATP	Adenosintriphosphat
azA	Azido-L-alanin
azHA	Azido-L-homoalanin
azF	<i>p</i> -Azido-L-phenylalanin
BLUF	Blaulichtrezeptor, engl. <i>sensor of blue light using EAD</i>
bp	Basenpaar
BPF	Bandpassfilter
bR	bovines Rhodopsin
BR	Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i>
BTP	1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)-methylaminopropan)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChETA	engl. <i>channelrhodopsin-ET-accelerated</i>
CHO	Subklon einer immortalisierten Zelllinie aus Eizellen des Chinesischen Zwerghamsters, engl. <i>chinese hamster ovary</i>
ChR	(kationenleitendes) Kanalrhodopsin
CMV	Cytomegalievirus
COS-1	Immortalisierte Zelllinie aus Nierenfibroblasten der afrikanischen grünen Meerkatze, engl. <i>CV-1 in Origin</i>
CP	Cytoplasma (-Fraktion)
CV	Säulenvolumen, engl. <i>column volume</i>
DA _{app}	apparenter Dunkelzustand
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltopyranosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DIBO	Dibenzocyclooctin
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium

DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
DPBS	Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat(-Fraktion)
EADS	engl. <i>evolution-associated difference spectra</i>
EC	extrazelluläre Seite
ECL	extrazellulärer Loop
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	engl. <i>E90-Helix2-Tilt</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadenosindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FT	Durchfluss, engl. <i>flow through</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot (-Spektroskopie)
FWHM	Halbwertsbreite, engl. <i>full width at half maximum</i>
GOI	Zielgen, engl. <i>gene of interest</i>
H	transmembrane α -Helix
HEK293	Immortalisierte Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, engl. <i>human embryonic kidney cells</i>
HKR1	Histidin-Kinase-Rhodopsin-1
HPLC	Hochleistungschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HR	Halorhodopsin
IB	Einschlusskörperchen, engl. <i>inclusion bodies</i>
IC	intrazelluläre Seite (Cytoplasma)
ICL	intrazellulärer Loop
IDA	Initialer Dunkelzustand
IMAC	Immobilisierte-Metallionen Affinitätschromatographie
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaar
KR2	Natriumpumpe aus <i>Krokinobacter eikastus</i>
Laser	engl. <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	Nährmedium, engl. <i>lysogeny broth</i>
LED	Leuchtdiode, engl. <i>light-emitting diode</i>
LOV	Blaulichtrezeptor, engl. <i>light-oxygen-voltage</i>

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MF	Membranfraktion
Mistic	engl. <i>membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs</i> aus <i>Bacillus subtilis</i>
MTHF	N5,N10-Methylen-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure
M _w	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewicht der Ausschlussgrenze, engl. <i>molecular weight cut-off</i>
NIR	nahes Infrarot(-Licht)
NMR	Kernspinresonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
ori	Replikationsursprung, engl. <i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	engl. <i>Protein Data Base</i>
PEI	Polyethylenimin
Pgl	Protein-Glykosylierungsmaschinerie aus <i>Campylobacter jejuni</i> , engl. <i>protein glycosylation</i>
PI	Proteaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Diphosphat, Pyrophosphat
PTM	post-translationale Modifikation
PR	Proteorhodopsin
PRG	engl. <i>proton release group</i>
PYP	engl. <i>Photoactive Yellow Protein</i>
RSB	Retinal Schiff'sche Base
RSBH ⁺	protonierte Retinal Schiff'sche Base
RT	Raumtemperatur
SASA	engl. <i>solvent accessible surface area</i>
SCS	Stopp-Codon-Suppression
SDIL	Ortsgerichtete Isotopenmarkierung, engl. <i>site-directed isotopic labeling</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFO	engl. <i>step function opsin</i>
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur, engl. <i>stable isotopic labeling of amino acids in cell culture</i>
SN MF	solubilisierter Membranfraktion
SPI	Supplementationseinbau, engl. <i>selective pressure</i> bzw. <i>supplementation-based incorporation</i>
SRI / SRII	Sensorisches Rhodopsin I bzw. II

SV40	Simian-Virus 40
SVD	Singulärwertzerlegung, engl. <i>singular value decomposition</i>
TAT	Twin-Arginin-Transport
TEV	Tabakätzvirus, engl. <i>Tobacco etch virus</i>
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	ultraviolett
UVR8	UV-Rezeptor, engl. <i>UV RESISTANCE LOKUS 8</i>
vis	sichtbar, engl. <i>visible</i>
VPS	Valproinsäure
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus dem terrestrischen Sonnenspektrum.....	2
Abbildung 2: Chemische Struktur von typischen Chromophoren und spektrale Eigenschaften ihrer Photorezeptoren.	3
Abbildung 3: Vektorieller Protontransport und Photozyklus in Bakteriorhodopsin.	8
Abbildung 4: Struktur der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2.	13
Abbildung 5: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren DC-Paaren.	17
Abbildung 6: Photozyklen von <i>CrChR2</i> und <i>CaChR1</i> nach Laseranregung.....	23
Abbildung 7: Photozyklus von <i>CrChR2</i> unter Dauerlicht.	26
Abbildung 8: Retinal-Isomere in <i>CrChR2</i>	29
Abbildung 9: Wasserverteilung in C1C2 und C1C2-GA im geschlossenen Dunkelzustand.....	35
Abbildung 10: Flexible Proteinregionen in der C1C2-Kristallstruktur und das <i>E90-Helix2-Tilt</i> -Modell.	36
Abbildung 11: Mechanismen der Farbverschiebung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen.....	38
Abbildung 12: Farbverschiebung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen.	39
Abbildung 13: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren Gegenionenkomplexen.	40
Abbildung 14: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren Aminosäuren am β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors.	43
Abbildung 15: Koplanarität von Polyenkette und β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors.....	44
Abbildung 16: Attenuation von einstrahlendem Licht an biologischen Geweben.	46
Abbildung 17: N-Glykosylierung in <i>Escherichia coli</i>	51
Abbildung 18: Methoden zur Einführung von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine.....	53
Abbildung 19: Übersicht einiger unnatürlicher Aminosäuren für spektroskopische Anwendungen.....	56
Abbildung 20: Glykosylierung von ChRs exprimiert in <i>Escherichia coli</i>	108

Abbildung 21: Expression von <i>PgChR1</i> in <i>E. coli</i>	109
Abbildung 22: Expression von <i>CrChR2</i> in stabil transfizierter HEK293-Tet-On-Zelllinie.	112
Abbildung 23: Expression von C1C2 in HEK293 und COS-1.	114
Abbildung 24: Expression von C1C2 und <i>CrChR2</i> in HEK293T und FreeStyle 293-F.	117
Abbildung 25: UV-vis-Spektroskopie von <i>CrChR2</i> (-H134R) und C1C2.....	119
Abbildung 26: pH-Abhängigkeit von <i>CrChR2</i> -H134R und C1C2.	122
Abbildung 27: Expression von ReaChR in HEK293T-Zellen.	125
Abbildung 28: Rekonstitution von ReaChR mit all- <i>trans</i> - und N-Oxid-Retinal.....	128
Abbildung 29: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von ReaChR.	130
Abbildung 30: pH-Abhängigkeit des Dunkelzustands von ReaChR.	131
Abbildung 31: pH-Abhängigkeit des Photozyklus von ReaChR.	133
Abbildung 32: Lichtadaptation von ReaChR bei pH 7.4.....	136
Abbildung 33: Lichtadaptation von ReaChR bei pH 5.0 und pH 9.0.	138
Abbildung 34: Wellenlängenabhängigkeit des Photozyklus von ReaChR.....	140
Abbildung 35: Salzabhängigkeit von ReaChR.....	141
Abbildung 36: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-C168T.	142
Abbildung 37: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-C168S.....	144
Abbildung 38: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-D196N.....	146
Abbildung 39: Stationäre UV-vis-Spektroskopie und pH-Abhängigkeit von ReaChR-E130Q.....	148
Abbildung 40: Transiente UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-E130Q.....	149
Abbildung 41: pH-Abhängigkeit von ReaChR-E163T und -D293N.....	150
Abbildung 42: Transiente UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-E163T und -D293N.	152
Abbildung 43: FTIR-Charakterisierung von frühen Photozyklusintermediaten in ReaChR....	154
Abbildung 44: Spektrale Zusammensetzung der photostationären Zustände von ReaChR und Mutanten.....	155

Abbildung 45: Chromophorstruktur in ReaChR und Mutanten.	158
Abbildung 46: Protontransferprozesse in ReaChR.	159
Abbildung 47: Photoaktives Cystein in ReaChR.	162
Abbildung 48: Stopp-Codon-Suppression in ChRs.	164
Abbildung 49: Bio-orthogonale Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe.	166
Abbildung 50: Elektrophysiologische Evaluierung des orthogonalen Paares und Charakterisierung von ReaChR-Y110azF.	169
Abbildung 51: FTIR-Spektroskopie an <i>p</i> -Azido-L-phenylalanin und ReaChR-Y110azF.	172
Abbildung 52: Stationäre UV-vis- und FTIR-Spektroskopie von ReaChR-Azidomutanten.	176
Abbildung 53: Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie von ReaChR-Azidomutanten.	179
Abbildung 54: Expression und elektrophysiologische Charakterisierung von Mutanten des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF.	182
Abbildung 55: <i>Rapid-scan</i> -FTIR-Spektroskopie von Mutanten des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF.	183
Abbildung 56: Farbverschiebung von CrChR2 nach ReaChR.	191
Abbildung 57: Einfluss von E87 auf die pH-Abhängigkeit.	195
Abbildung 58: Korrelation zwischen der pH-Abhängigkeit und den pK_s -Werten der Gegenionen.	197
Abbildung 59: Frühe Photozyklusintermediate von ReaChR.	200
Abbildung 60: Photozyklus, Protontransferreaktionen und Lichtadaptation in ReaChR.	205
Abbildung 61: Hydratisierungsänderungen der Kanalpore in ReaChR.	213
Abbildung A 1: Lösungsmittelabhängigkeit von all- <i>trans</i> - und N-Oxid-Retinal.	256
Abbildung A 2: UV-vis-Spektren der aromatischen Aminosäuren und dem Dipeptid Cystin.	256
Abbildung A 3: UV-vis-Spektrum von C1V1-25A.	257
Abbildung A 4: Transiente UV-vis-Spektroskopie von C1C2-E129A in Abhängigkeit der Salzkonzentration.	257

Abbildung A 5: Gegenionenmutanten von Chronos.....	258
Abbildung A 6: DC-Paar-Mutanten von <i>CoChR</i> und Chronos.....	258
Abbildung A 7: Transiente UV-vis-Spektroskopie des anionenleitenden <i>PsACR1</i> und E64R.	259
Abbildung A 8: Expression von Chrimson-Varianten und Doppelbelichtungsexperimente an <i>CsChrimson</i>	260
Abbildung A 9: Transiente UV-vis-Spektroskopie von <i>CsChrimson</i>	261
Abbildung A 10: Photostationäre FTIR-Differenzspektren von <i>ReaChR</i> und Mutanten.	262
Abbildung A 11: Western-Blots von Azidomutanten von <i>C1C2</i>	262
Abbildung A 12: FTIR-Dunkelspektren von <i>ReaChR</i> und Azidomutanten.....	263
Abbildung A 13: Vergleich von photostationären und <i>rapid-scan</i> -FTIR-Differenzspektren der Azidomutanten.	264
Abbildung A 14: FTIR-Amplitudenspektrum von <i>ReaChR</i> -Y110azF-N305H.....	265
Abbildung A 15: <i>Step-scan</i> -FTIR-Spektren von <i>ReaChR</i> und Y110azF.....	265

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktion und Vorkommen verschiedener Photorezeptoren	1
Tabelle 2: Kinetischer Einfluss von Mutationen des DC-Paars in Rhodopsinen.	18
Tabelle 3: Retinal-Isomerenverhältnis in Kanalrhodopsinen.	30
Tabelle 4: Protochrome Farbverschiebungen in Kanalrhodopsinen.....	34
Tabelle 5: Farbverschiebungen in Rhodopsinen durch Mutagenese des Gegenionenkomplexes.	41
Tabelle 6: Farbverschiebungen in Rhodopsinen durch Mutagenese von Aminosäuren am β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors.	43
Tabelle 7: Kanalrhodopsin-Varianten für optogenetische Anwendungen.	48
Tabelle 8: Inkorporationsmethoden der illustrierten unnatürlichen Aminosäuren.....	59
Tabelle 9: Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	63
Tabelle 10: Puffer für die Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.	64
Tabelle 11: <i>E. coli</i> -Stämme für die Amplifikation von extrachromosomaler DNA und für molekularbiologische Klonierungsarbeiten.....	65
Tabelle 12: Zusammensetzung PCR-Ansatz für die ortsgerichtete Mutagenese.....	66
Tabelle 13: PCR-Temperaturprotokoll für die ortsgerichtete Mutagenese.	66
Tabelle 14: PCR-Temperaturprotokoll für die Einführung von DNA-Fragmenten	67
Tabelle 15: Oligonukleotide für die Sequenzierung einzelner Plasmide.	68
Tabelle 16: Gene für die Expression in <i>E. coli</i>	69
Tabelle 17: Vektoren für die Expression in <i>E. coli</i>	70
Tabelle 18: Induktorkonzentrationen der induzierbaren Expressionsvektoren	70
Tabelle 19: Antibiotikakonzentration für die Selektionierung von Transformanten.....	71
Tabelle 20: <i>E. coli</i> -Expressionsstämme.....	71
Tabelle 21: Gene für die Expression in tierischen Säugerzellen.	74

Tabelle 22: Vektoren für die Expression in tierischen Säugerzellen.	75
Tabelle 23: Medien für die Kultivierung von tierischen Säugerzellen.	78
Tabelle 24: Transfektion von COS-1 mit DEAE-Dextran und Chloroquin.	87
Tabelle 25: Transfektionsmethoden.	90
Tabelle 26: Puffer für die Aufreinigung aus COS-1 und HEK293.	91
Tabelle 27: Retinale.	93
Tabelle 28: Antikörper für Western Blot.	97
Tabelle 29: LEDs.	97
Tabelle 30: Software und bioinformatische Vorhersageprogramme.	106
Tabelle 31: Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in <i>E. coli</i>	110
Tabelle 32: Expression von blau-absorbierenden ChRs in Säugerzellen.	116
Tabelle 33: Zusammensetzung von Lipidmembranen in verschiedenen Organismen.	187
Tabelle 34: Pflanzliche und bakterielle Signalsequenzen.	189
 Tabelle A 1: Auflistung von Herstellern	 266
Tabelle A 2: Auflistung der verwendeten Geräte.	269

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract	III
Publikationsliste.....	V
Poster- und Vortragspräsentationen.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Photorezeptoren.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Blaulichtrezeptoren.....	4
1.1.3 Phytochrome und Cyanobacteriochrome	5
1.1.4 UVR8	6
1.1.5 Rhodopsine	6
1.2 Mikrobielle Rhodopsine.....	7
1.2.1 Bakteriorhodopsin und andere Ionenpumpen	7
1.2.2 Rhodopsine in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
1.2.3 Enzymrhodopsine.....	10
1.3 Kanalrhodopsine	11
1.3.1 Allgemeines	11
1.3.2 Struktur und Funktion.....	12
1.3.3 Kanalpore.....	14
1.3.4 Zentrales Tor	14
1.3.5 Inneres Tor	15
1.3.6 Retinal-Bindetasche	16
1.3.7 DC-Paar.....	16
1.3.8 Gegenionenkomplex	19
1.3.9 C-Terminus	21
1.3.10 Photozyklus nach Laseranregung.....	22
1.3.11 Photozyklus unter Dauerlicht	25
1.3.12 Leitender Zustand.....	27
1.3.13 Retinal-Isomere	28
1.3.14 Kombinierte Photozyklus-Modelle	32
1.3.15 pH-Effekte	33
1.3.16 Photoaktivierung.....	33

1.3.17	Farbverschiebung	37
1.3.18	Kanalrhodopsin als optogenetisches Werkzeug	45
1.4	Expression von mikrobiellen Rhodopsinen	49
1.5	N-Glykosylierung für die Expression in <i>Escherichia coli</i>	51
1.6	Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren	52
1.6.1	Inkorporationsmethoden	52
1.6.2	Spektroskopie mithilfe unnatürlicher Aminosäuren	57
1.7	Zielsetzung	60
2.	Material und Methoden	62
2.1	Mikrobiologische Methoden	62
2.1.1	Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	62
2.1.2	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
2.1.3	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	62
2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Fremd-DNA	63
2.2	Molekularbiologische Methoden	64
2.2.1	Agarosegelelektrophorese	64
2.2.2	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	64
2.2.3	Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA	65
2.2.4	Design und Synthese von Oligonukleotiden	65
2.2.5	Ortsgerichtete Mutagenese	65
2.2.6	Einführung von DNA-Sequenzen	67
2.2.7	Kolonie-PCR	67
2.2.8	Restriktionsanalyse	67
2.2.9	Ligation	68
2.2.10	Sequenzierungen	69
2.3	Expression in <i>Escherichia coli</i>	69
2.3.1	Gene	69
2.3.2	Vektoren	70
2.3.3	Stämme	71
2.3.4	Kultivierung, Induktion und Zellernte	72
2.3.5	Aufreinigung	72
2.4	Expression in tierischen Säugerzellen	74
2.4.1	Gene	74
2.4.2	Vektoren	75
2.4.3	Zelllinien	75
2.4.4	Brutschrank	77
2.4.5	Medien	77
2.4.6	Reaktivierung von kryokonservierten Zellen	78

2.4.7	Zellzahlbestimmung	79
2.4.8	Vitalitätsprüfung.....	79
2.4.9	Mycoplasmen-Test.....	79
2.4.10	Kultivierung und Passagierung von adhärierenden Zellen.....	80
2.4.11	Kultivierung von Suspensionszellen	80
2.4.12	Suspensionsadaptation	80
2.4.13	Vorbereitung zur Kryokonservierung von tierischen Zellen	83
2.4.14	Expression in stabil transfizierter HEK293-Zelllinie	83
2.4.15	Immunoaffinitätschromatographie	84
2.4.16	Aufreinigung aus stabil transfizierter HEK293-Zelllinie	86
2.4.17	Expression in COS-1.....	87
2.4.18	Expression in HEK293/T und CHO-K1.....	88
2.4.19	Expression in FreeStyle 293-F	91
2.4.20	Aufreinigung aus COS-1 und HEK293.....	91
2.4.21	Aufreinigung aus FreeStyle 293-F und HEK293T	92
2.4.22	Chromophorrekonstitution von Apoprotein.....	93
2.5	Expression in der methylotrophen Hefe <i>Pichia pastoris</i>	93
2.6	Proteinanalytik	94
2.6.1	Konzentrationsbestimmung.....	94
2.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	94
2.6.3	Western Blot nach Towbin.....	95
2.7	UV-vis-Absorptionsspektroskopie	97
2.7.1	Belichtung	97
2.7.2	Stationäre UV-vis-Absorptionsspektroskopie	97
2.7.3	Kinetische UV-vis-Absorptionsspektroskopie.....	98
2.7.4	Kryostatische UV-vis-Absorptionsspektroskopie.....	98
2.7.5	Transiente UV-vis-Absorptionsspektroskopie	98
2.8	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	101
2.8.1	Photostationäre Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie.....	101
2.8.2	<i>Rapid-scan</i> -Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	102
2.8.3	<i>Step-scan</i> -Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	102
2.8.4	Annäherung von Azido-FTIR-Differenzbanden.....	102
2.9	pH-Titrationen	104
2.10	Elektrophysiologische Messungen	104
2.11	Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie.....	105
2.12	Bio-orthogonale Kopplung von Azidomutanten mit Fluorophoren.....	105
2.13	Extraktion und chromatographische Trennung von Retinoiden	106
2.14	Software und bioinformatische Vorhersageprogramme	106

3. Resultate.....	107
3.1 Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in <i>Escherichia coli</i>	107
3.2 Charakterisierung von CrChR2(-H134R) und C1C2.....	111
3.2.1 Expression.....	111
3.2.2 UV-vis-Spektroskopie.....	118
3.2.3 pH-Abhängigkeit.....	121
3.3 Charakterisierung von ReaChR.....	124
3.3.1 Expression und Chromophorrekonstitution.....	124
3.3.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten.....	129
3.3.3 pH-Abhängigkeit des Dunkelzustands.....	130
3.3.4 pH-Abhängigkeit des Photozyklus.....	132
3.3.5 Lichtadaptation und Grundzustandsheterogenität.....	135
3.3.6 Photozyklus in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge.....	139
3.3.7 Einfluss der Salzkonzentration.....	141
3.3.8 Mutationen des DC-Paars.....	142
3.3.9 Mutation des Zentralen Tors.....	147
3.3.10 Mutationen des Gegenionenkomplexes.....	149
3.3.11 Schwingungsspektroskopie.....	153
3.4 Markierung von ChRs mit unnatürlichen, IR-aktiven Aminosäuren.....	163
3.4.1 Expressionseigenschaften von markierten ChRs.....	163
3.4.2 Bio-orthogonale Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe.....	165
3.4.3 Evaluierung der Orthogonalität des tRNA/aaRS-Paars.....	168
3.4.4 FTIR-Spektroskopie an freiem azF und ReaChR-Y110azF.....	170
3.4.5 Photostationäre FTIR-Differenzspektroskopie.....	174
3.4.6 Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie.....	178
3.4.7 Mutationen des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF.....	181
4. Diskussion.....	185
4.1 Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in <i>Escherichia coli</i>	185
4.2 Expression von Kanalrhodopsinen in HEK293T.....	190
4.3 Farbverschiebung in ReaChR.....	190
4.4 Protochromismus in Kanalrhodopsinen.....	193
4.5 Photozyklus und Protontransferreaktionen in ReaChR.....	199
4.6 Lichtadaptation und Grundzustandsheterogenität in ReaChR.....	203
4.7 Retinal-Konfiguration und Separation von Photozyklen.....	207
4.8 Hydratisierungsdynamiken innerhalb der Kanalpore von ReaChR.....	208
4.9 Stopp-Codon-Suppression und FTIR-Spektroskopie mit unnatürlichen Reportergruppen.....	216
5. Bibliographie.....	220

6. Appendix	256
6.1 Ergänzende Daten	256
6.1.1 Retinale	256
6.1.2 Aromatische Aminosäuren und Cystin.....	256
6.1.3 UV-vis-Spektroskopie von C1V1-25A	257
6.1.4 Salzabhängigkeit von C1C2-E129A	257
6.1.5 „Gegenionenmutanten“ von Chronos	258
6.1.6 DC-Paar-Mutanten von <i>C_o</i> ChR und Chronos	258
6.1.7 Transiente UV-vis-Spektroskopie von <i>Ps</i> ACR1.....	259
6.1.8 Expression und UV-vis-Spektroskopie von (Cs)Chrimson	260
6.1.9 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Mutanten	262
6.1.10 Western Blots von Azidomutanten von C1C2.....	262
6.1.11 FTIR-Dunkelspektren von ReaChR und Azidomutanten.....	263
6.1.12 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Azidomutanten.....	264
6.1.13 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR-Y110azF-N305H.....	265
6.1.14 <i>Step-scan</i> -FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Y110azF ..	265
6.2 Verwendete Geräte und deren Hersteller.....	266
Danksagung.....	271
Eigenständigkeitserklärung	274

1. Einleitung

1.1 Photorezeptoren

1.1.1 Allgemeines

Licht ist ein wichtiger Träger von Informationen sowie Energie und ist für viele terrestrische photoautotrophe und heterotrophe Lebensformen essentiell. Die Proteinfamilie der Photorezeptoren vermag es Licht wahrzunehmen und in Abhängigkeit der Lichtintensität, des Einstrahlwinkels und der Lichtfarbe definierte Prozesse innerhalb eines Organismus zu regulieren. Im Rahmen der Evolution haben sich eine Vielzahl von hochspezialisierten lichtsensorischen Proteinen entwickelt, welche diverse enzymatische, zelluläre und systemische Prozesse steuern. Darunter fallen z.B. Orientierung, (Fort-)Bewegung, Umschalten bestimmter Entwicklungsphasen, Reduktion von Strahlungsschäden, Synchronisation der zirkadianen Uhr, Stoffumwandlung und Energietransformation (Tabelle 1).

Tabelle 1: Funktion und Vorkommen verschiedener Photorezeptoren.

Rezeptor	Funktion	Vorkommen
UVR8	Akklimation (Lichtverhältnisse) Schutz vor erhöhter UV-B-Exposition	Pflanzen
Phototropin (LOV)	Phototropismus Bewegung von Chloroplasten & Blättern Öffnung der Schließzellen Synchronisation der zirkadianen Uhr Blütenbildung	Pflanzen Pilze Bakterien
BLUF	Regulierung Transkription von photosynthetischen Genen Metabolismus cyclischer Nukleotide	Bakterien Euglenozoa Pilze
Cryptochrom	Blütenbildung, Deetiolierung Synchronisation der zirkadianen Uhr Magnetorezeption DNA-Reparatur	Planzen Tiere Bakterien
Xanthopsin	negative Phototaxis Regulierung der Expression der Chalcon-Synthase	Bakterien
Rhodopsine	Orientierung Phototaxis Aufbau elektrochemischer Gradient Metabolismus cyclischer Nukleotide	Archaeen Bakterien Algen Pilze, Tiere
Phytochrom / Cyanobacteriochrom	Photomorphogenese (Hypocotylidation, Blätterbildung, Assemblierung Photosynthese-Einheit) Orientierung der Chloroplasten Entwicklung des Geschlechts	Pflanzen Bakterien Pilze

Photorezeptoren sind evolutionär optimiert worden, um eine möglichst hohe Effizienz des katalysierten Prozesses zu gewährleisten, wobei im Kontext von lichtaktiven Proteinen von Quantenausbeute gesprochen wird. Ungewollte Nebenreaktionen, welche die Quantenausbeute verringern würden, sollen vermieden werden. Dies wird durch z.B. kurze Lebenszeiten (\sim fs) von angeregten Zuständen realisiert. Aufgrund der Kurzlebigkeit und der schnellen Umwandlung in primäre Photoprodukte verringert sich die Wahrscheinlichkeit für dissipative Prozesse wie Wärmeabgabe durch interne Konversion.

Licht ist elektromagnetische Strahlung und wird abhängig von seiner Wellenlänge in verschiedene spektrale Bereiche unterteilt (Abbildung 1). Dabei erstreckt sich das für Menschen sichtbare (vis, engl. *visible*) Farbspektrum von $\lambda = 380 - 680$ nm (lila bis dunkelrot). Elektromagnetische Strahlung mit kürzerer Wellenlänge ($\lambda = 100 - 380$ nm) wird ultraviolette (UV) und mit größerer Wellenlänge ($\lambda = 680 - 3000$ nm) infrarote (IR) Strahlung genannt. Terrestrische Sonnenstrahlung hat ihr Intensitätsmaximum zwischen 500 und 550 nm, wobei sich das Spektrum näherungsweise mit dem eines Schwarzen Strahlers bei ca. 6000 K approximieren lässt (Appleton 1945). Die Energie eines Photons des sichtbaren Spektrums (160 - 320 kJ/mol) reicht aus, um bestimmte chemische Reaktionen wie Elektronentransfer (Cryptochrome), Bildung (LOV-Proteine) und Bruch (BLUF-Proteine) einer kovalenten Bindung sowie Isomerisierung einer Kohlenstoff-Doppelbindung (Xanthopsine, Rhodopsine & Phytochrome) zu katalysieren (Abbildung 2A).

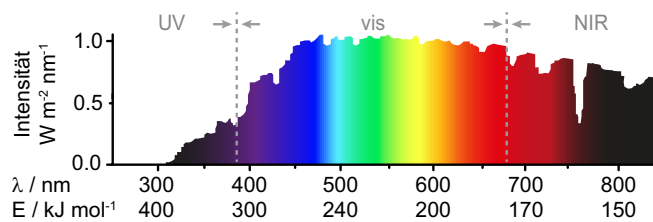


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem terrestrischen Sonnenspektrum. Daten entnommen aus Hulstrom *et al.* (1985).

Dem Umstand geschuldet, dass die Grundbausteine der Proteine, die Aminosäuren, nur kurzwelliges UV-Licht ($\lambda < 300$ nm) absorbieren können, bedient sich die Natur für das restliche Farbspektrum organischer Moleküle als Lichtantennen (Chromophore, altgriech. *chroma phorós*, Farbe tragend). Im menschlichen Körper haben diese Verbindungen häufig Vitamin-Status und müssen daher über die Nahrung aufgenommen werden. Im Laufe der Evolution ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Chromophoren sowie komplementärer Apoproteine entstanden, welche den im jeweiligen Habitat vorliegenden Lichtverhältnissen angepasst und optimiert wurden. Chromophore bestehen zum größten Teil aus konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungssystemen, wobei die Größe des delokalisierten π -Elektronen-Systems die Absorptionswellenlänge des Rezeptors bestimmt. Während ausgedehnte konjugierte Systeme wie z.B. die Tetrapyrrole in den Phytochromen eher sensitiv für längerwelliges rotes Licht sind, absorbieren kürzere Doppelbindungssysteme wie z.B. in den Flavinen von LOV und BLUF eher im blauen Spektralbereich. Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Absorptionsverhalten

verschiedener Photorezeptoren sowie deren gebundene Cofaktoren. Die nächsten Abschnitte geben einen kurzen Einblick in die Funktion der einzelnen Photorezeptoren sowie deren spektrale Eigenschaften.

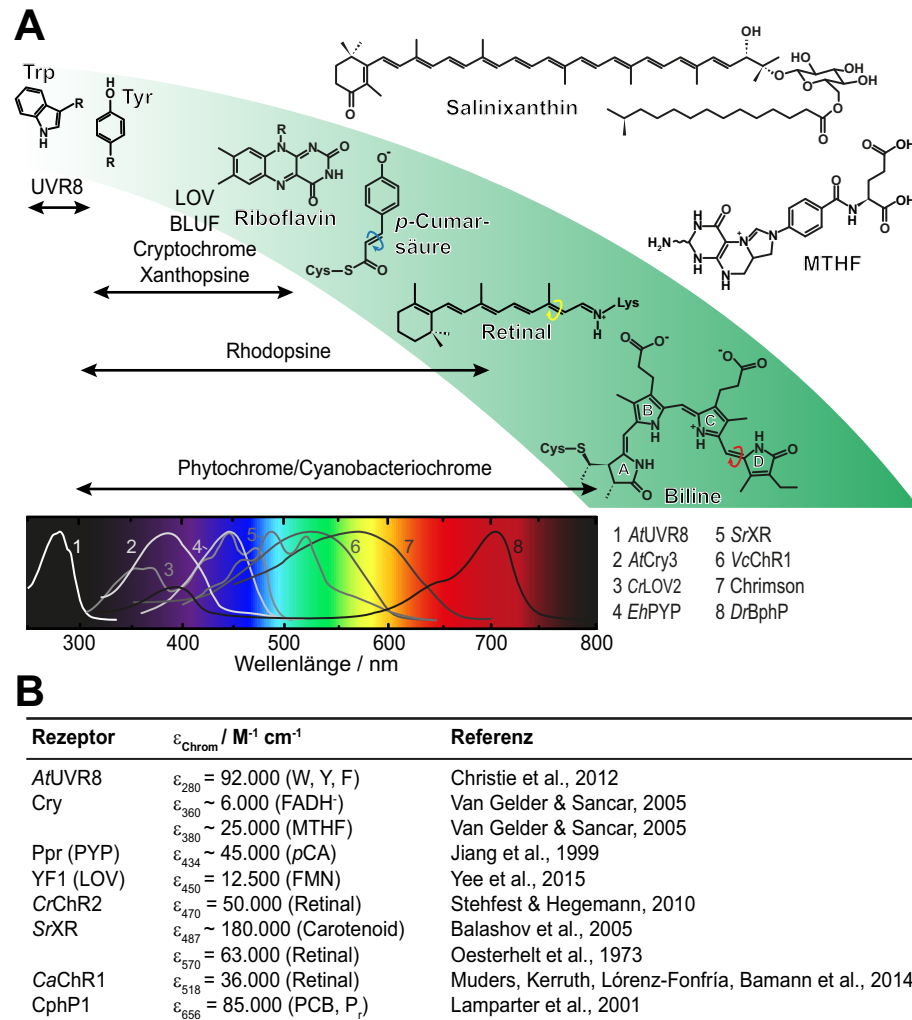


Abbildung 2: Chemische Struktur von typischen Chromophoren und spektrale Eigenschaften ihrer Photorezeptoren. A) Der Absorptionsbereich (schwarze Pfeile) einiger Photorezeptoren sowie die Strukturformel eines typischen Chromophors sind dargestellt. Die Absorption eines Photons katalysiert in drei der gezeigten Rezeptorklassen eine Isomerisierung einer C=C-Doppelbindung im Chromophor (runde Pfeile). Cryptochrome und manche Rhodopsine wie Xanthorhodopsin tragen eine zweite prosthetische Gruppe (MTHF bzw. Salinixanthin), welche unter physiologischen Bedingungen als primärer Chromophor fungieren. UV-vis-Spektren (normiert auf 280 nm, Proteinpeak nicht dargestellt) entnommen aus den folgenden Referenzen: AtCry3, Cryptochrom-3 aus *Arabidopsis thaliana* (Pokorny et al. 2005); AtUVR8, UVR8 aus *A. thaliana* (Christie et al. 2012); CrLOV2, Phototropin-LOV-Domäne-2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Guo et al. 2005); Chrimson, Kanalrhodopsin (ChR) aus *C. noctigama*, eigene Messung; DrBphP, Bakteriophytochrom aus *Deinococcus radiodurans*, rotes P_r-Isomer (Wagner et al. 2008); EhPYP, Photoactive Yellow Protein aus *Ectothiorhodospira halophila* (Sprenger et al. 1993); SrXR, Xanthorhodopsin aus *Salinibacter ruber* (Balashov et al. 2005); VcChR1, ChR1 aus *Volvox carter* (Kianianmomeni et al. 2009). **B)** Extinktionskoeffizienten ausgewählter Photorezeptoren. Cry, Cryptochrom; Ppr, PYP-Phytochrom aus *Rhodospirillum rubrum*, pCA, p-Cumarsäure; YF1, Designierte LOV-Histidin-Kinase; CrChR2, *C. reinhardtii* ChR2; CaChR1, *C. angustae* ChR1; CphP1, *Synechocystis* sp. PCC6803 Cyanobacteriochrom-1; PCB, Phycocyanobilin.

1.1.2 Blaublichtrezeptoren

Zu der Gruppe der Blaublichtrezeptoren zählen Phototropine, BLUF, Cryptochrome und Xanthopsine. Phototropine sind lichtabhängige Serin/Threonin-Kinasen und sind in Pflanzen für Phototropismus, Bewegung von Chloroplasten und Blättern sowie für die Öffnung der Schließzellen verantwortlich (Christie *et al.* 1998; Christie 2007). Sie sind modular aufgebaut, d.h. sie bestehen wie viele andere Photorezeptoren auch, nicht nur aus einerlichtsensitiven Domäne (Sensor), sondern sind mit einem Effektor (z.B. Kinase) gekoppelt. Diese Fusionierung ermöglicht eine schnelle Umwandlung des primären lichtinduzierten Signals in eine sekundäre Antwort. Das sensorische Modul in den Phototropinen ist die LOV-Domäne (engl. *light-oxygen-voltage*), welche erstmals aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurde und dort sogar als Tandem vorliegt (Christie *et al.* 1998). Sie beherbergt ein nicht kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN), ein einfach phosphoryliertes Riboflavin (Vitamin B₂, Abbildung 2A) als Chromophor, welcher maßgeblich zur gelben (lat. *flavus*) Farbe des Proteins beiträgt. Das Holoprotein zeigt ein UV-vis-Absorptionsspektrum mit einem feinstrukturierten Hauptmaximum bei $\lambda \sim 450$ nm sowie einem ebenfalls feinstrukturierten Nebenmaximum bei $\lambda \sim 350$ nm (Abbildung 2A). Die ausgeprägte Feinstruktur im Hauptmaximum ist charakteristisch für ein voll oxidiertes Flavin.

Ein sehr ähnliches UV-vis-Absorptionsspektrum weisen die BLUF-Proteine (engl. *sensors of blue light using FAD*) auf, was primär mit der Gleichartigkeit des inkorporierten Chromophors zu begründen ist. Anstelle eines FMN bedienen sie sich einem Flavinadenosindinukleotid (FAD), in welchem der Riboflavin-Grundkörper mit Adenosindiphosphat verknüpft ist. BLUF-Rezeptoren wurden hauptsächlich in Prokaryoten identifiziert und wirken dort als Transkriptionsfaktor von photosynthetischen Genen (Gomelsky & Kaplan 1998; Masuda & Bauer 2002). In der Natur kommen sie nicht nur als singuläre Einheit vor, sondern sind mit Effektordomänen wie z.B. einer Diguanylat-Phosphodiesterase (Schmidt *et al.* 2005; Tyagi *et al.* 2008; Barends *et al.* 2009) oder einer Nukleotidzyklase (Iseki *et al.* 2002; Stierl *et al.* 2011; Ohki *et al.* 2016) gekoppelt.

Die dritte Gruppe der flavinabhängigen Blaublichtrezeptoren bilden die redoxaktiven Cryptochrome. Cryptochrome sind weit verbreitete sensorische Proteine in Tieren und Pflanzen, in welchen sie entwicklungsbedingte Prozesse wie Blütenbildung und Deetiolierung induzieren (Guo *et al.* 1998; Lin *et al.* 1998) sowie für die Synchronisation der zirkadianen Uhr verantwortlich sind (Griffin Jr. *et al.* 1999; van der Horst *et al.* 1999). Des Weiteren wird ihnen eine entscheidende Rolle bei der Magnetorezeption von Zugvögeln und anderen Tieren zugesprochen (Ritz *et al.* 2000; Wiltschko & Wiltschko 2005; Rodgers & Hore 2009; Kutta *et al.* 2017). Die cry-DASH-Familie (*Drosophila-Arabidopsis-Synechocystis-Homo*) stellt eine gesonderte Gruppe der Cryptochrome dar, deren Vertreter in die DNA-Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren involviert sind. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu den Photolyasen wird eine phylogenetische Verwandtschaft angenommen (Brudler *et al.* 2003). Neben dem eingebetteten FAD-Cofaktor beinhalten Cryptochrome eine zweite stärker absorbierende prosthetische Gruppe (MTHF, N⁵,N¹⁰-Methylen-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, $\epsilon_{380} \sim 25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Derivat der Folsäure (Vitamin B₉)), welche aufgrund des geringen

Extinktionskoeffizienten des vollreduzierten Flavins (FADH⁻, $\epsilon_{360} \sim 6.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) als primärer Lichtempfänger fungiert (Van Gelder & Sancar 2005). Die absorbierte Energie des MTHF wird hierbei über eine Distanz von ca. 15 Å mittels Förster-Resonanz-Elektronen-Transfer an den Isoalloxazin-Ring des FAD's übertragen (Song *et al.* 2006; Klar *et al.* 2007). Das UV-vis-Spektrum von *A/Cry3* zeigt entsprechend eine starke Absorptionsbande des MTHF-Cofaktors bei ca. 380 nm und nur eine dezente Schulter des Flavins bei ca. 480 nm (Abbildung 2A).

PYP (engl. *Photoactive Yellow Protein*) ist der bekannteste Vertreter der Klasse der Xanthopsine. Als photoaktives Molekül bindet es das Phenolat-Anion der *p*-Cumarsäure (*p*CA) kovalent über einen Thioester (Abbildung 2A). PYP ist ein kleines cytoplasmatisches Protein und gehört aufgrund der konservierten Proteinfaltung wie die LOV-Domänen zu der PAS-Familie (Per-ARNT-Sim). Bis dato ist die physiologische Funktion und potentielle Interaktionspartner von isolierten PYP-Domänen noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wurde in dem Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halophila*, dem am besten untersuchten PYP-Wirt, eine photophobische Reaktion auf Blaulicht festgestellt, dessen wellenlängenabhängige Antwort sich gut mit dem Absorptionsspektrum des isolierten Proteins ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$, Abbildung 2A) in Einklang bringen lässt (Sprenger *et al.* 1993). In dem PYP-abhängigen Phytochrom Ppr aus *Rhodospirillum rubrum* wurde des Weiteren ein Einfluss auf die Genexpression der Chalcon-Synthase postuliert (Jiang *et al.* 1999).

1.1.3 Phytochrome und Cyanobacteriochrome

Zusammen mit den Phototropinen und den Cryptochromen sind die Phytochrome verantwortlich für die Photomorphogenese in Pflanzen (Chen *et al.* 2004). Sie bewirken die Reduzierung des Längenwachstums (Hypocotylidation), Blätterbildung sowie Entwicklung und Assemblierung der photosynthetisch wirksamen Proteinkomplexe. Circa 40 Jahre nach der Entdeckung der pflanzlichen Phytochrome (Phy) (Butler *et al.* 1959) wurden sie in Cyanobakterien (Cyanobacteriochrome, CphP) (Yeh *et al.* 1997; Hughes *et al.* 1997) und überraschenderweise auch in heterotrophen Bakterien (Bakteriophytochrome, BphP) (Davis *et al.* 1999) identifiziert. Sie sind modular aufgebaut und mit verschiedenen Effektor-domänen z.B. Histidin-Kinasen assoziiert (Yeh *et al.* 1997; Davis *et al.* 1999). Phytochrome sind schaltbare Photorezeptoren mit zwei thermisch stabilen Zuständen, welche sich mittels Belichtung ineinander überführen lassen. Nach Absorption von rotem Licht wird die rot-absorbierende P_r-Isoform in eine dunkelrote (engl. *far-red*) P_{fr}-Isoform konvertiert. Da dieser Prozess vollständig reversibel ist, kann der bevölkerte P_{fr}-Zustand durch Applikation eines dunkelroten Lichtpulses wieder in den Ausgangszustand (P_r) überführt werden. Alle Phytochrome bedienen sich einem kovalent gebundenen, stark-absorbierenden linearen Tetrapyrrol (Bilin, $\epsilon \sim 85.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) zur Detektion des langwelligen Lichts (Lamparter *et al.* 2001). Die drei am häufigsten vorkommenden Biline, Biliverdin, Phycocyanobilin (PCB) und Phytychromobilin, unterscheiden sich in der Anzahl der ungesättigten Doppelbindungen im Pyrrol-Ring A bzw. im Substituenten am Kohlenstoffatom-18 im Ring D, was sich in einer spektralen Verschiebung des

Absorptionsmaximums äußert (Anders & Essen 2015). Abbildung 2A zeigt exemplarisch den PCB-Chromophor, welcher im cyanobakteriellen Phytochrom-1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 sowie in Grünalgen vorkommt (Yeh *et al.* 1997). Vertreter der Phytochrome und Cyanobacteriochrome überstrecken das gesamte spektrale Fenster zwischen 350 und 800 nm und sind damit die Photorezeptor-Klasse mit der größten Bandbreite (Abbildung 2A). UV-vis-Spektren der tetrapyrrolbindenden Proteine zeigen neben der breiten Chromophorbande eine markante Seitenbande bei ca. 400 nm (Soret-Bande), welche auch für die Photoaktivierung genutzt werden kann (Gasser *et al.* 2014).

1.1.4 UVR8

Eine Ausnahme der vorher behandelten cofaktorabhängigen lichtsensitiven Proteine, stellt der pflanzliche Photorezeptor *UV RESISTANCE LOCUS 8* (UVR8) aus *Arabidopsis thaliana* dar. UVR8 bedient sich keinem externen Cofaktor, sondern nutzt ein Arrangement aus einigen aromatischen Aminosäuren, vor allem Tryptophane und Tyrosine, um UV-B-Licht zu detektieren (Christie *et al.* 2012; Wu *et al.* 2012). Nach Absorption eines UV-B-Photons ($\lambda = 280 - 315$ nm) dissoziiert das im Dunklen vorliegende Homodimer zu zwei getrennten Monomeren und wechselwirkt mit der E3-Ubiquitin-Ligase COP1 (*CONSTITUTIVELY MORPHOGENIC 1*). Diese Interaktion initiiert eine Signalkaskade, infolgedessen eine Vielzahl von Genen transkribiert wird, welche die Adaptation der Pflanze an die vorliegenden Lichtverhältnisse (Akklimatisation) regulieren und somit etwaige Strahlenschäden durch erhöhte UV-B-Exposition reduzieren (Brown *et al.* 2005; Rizzini *et al.* 2011).

1.1.5 Rhodopsine

Rhodopsine binden das zu der Vitamin A-Klasse gehörige Diterpen Retinal, dessen Aldehydgruppe im Protein mit der ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysins zu einem Imin (Schiffschen Base) kondensiert und so den aktiven Chromophor bildet (Abbildung 2A). Historisch wird das Apoprotein als Opsin und das Holoprotein mitsamt Cofaktor als Rhodopsin bezeichnet. Rhodopsine absorbieren in einem weiten spektralen Bereich von UV bis Rot mit Extinktionskoeffizienten des Holoproteins von ca. 35.000 bis 60.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Abbildung 2B). Exemplarisch ist ein UV-vis-Spektrum eines grün- (*Volvox carteri* Kanalrhodopsin-1, *VcChR1*) und eines orangeabsorbierenden Kanalrhodopsins (Chrimson, ChR aus *Chlamydomonas noctigama*) in Abbildung 2 gezeigt. Wie im Falle der Cryptochrome bedienen sich manche Retinal-Proteine einer zusätzlichen prosthetischen Gruppe, um die spektrale Sensitivität bei anderen Wellenlängen des Lichts zu vergrößern bzw. erst zu ermöglichen. Die Protonenpumpe Xanthorhodopsin aus dem Eubakterium *Salinibacter ruber* hat neben einem Retinal-Molekül ($\lambda_{\text{max}} \sim 560$ nm (Holoprotein), $\epsilon_{560} \sim 63.000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) das stark absorbierende Carotenoid Salinixanthin ($\epsilon_{487} \sim 180.000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) eingebaut, welches im blaugrünen Spektralbereich absorbiert (Abbildung 2A) und die Energie mit einer hohen Effizienz (40 - 50 %) auf das Retinal-Molekül

überträgt (Balashov *et al.* 2005; Luecke *et al.* 2008). Aufgrund dessen dient Salinixanthin unter physiologischen Lichtverhältnissen als der primäre Chromophor. Rhodopsine katalysieren diverse Prozesse in allen Reichen des Lebens und werden ausführlicher, da ein Hauptfokus dieser Arbeit, in den folgenden Kapiteln behandelt.

1.2 Mikrobielle Rhodopsine

Mikrobielle Rhodopsine oder auch Typ 1-Rhodopsine wurden in Prokaryoten, Algen und Pilzen identifiziert, in denen sie diverse Prozesse wie Phototaxis, Energiehaushalt, Entwicklung und Retinal-Biosynthese kontrollieren (Spudich 2006). Typ 1-Rhodopsine bestehen zum größten Teil aus sieben transmembranen α -Helices und binden all-*trans*-Retinal (6-*s-trans*-Konformation der C₆-C₇-Bindung) an ein konserviertes Lysin in Helix 7 (H7). Nach Absorption eines Photons isomerisiert der Cofaktor in die 13-*cis*-Konformation. Damit unterscheiden sie sich von tierischen bzw. Typ 2-Rhodopsinen, welche im Dunkelzustand ein 11-*cis*-Retinal mit 6-*s-cis*-Konformation tragen und nach Lichtanregung zum all-*trans*-Isomer konvertieren (Ernst *et al.* 2014).

Die Klasse der mikrobiellen Rhodopsine beinhaltet neben auswärtsgerichteten Protonenpumpen wie Bakteriorhodopsin, einwärtsgerichteten Chloridpumpen wie Halorhodopsin und passiven Ionenkanälen wie Kanalrhodopsine, auch eine Reihe von Enzymrhodopsinen wie z.B. Rhodopsin-Cyclasen und Rhodopsin-Phosphodiesterasen. Je nach Wirkungsweise der einzelnen Vertreter wird nach Lichtabsorption entweder das elektrochemische Membranpotential oder die intrazelluläre Konzentration von sekundären Botenstoffen wie zyklisches Adenosinmonophosphat beeinflusst. Durch Expression von Typ 1-Rhodopsinen in fremden Zellen oder Gewebestrukturen lässt sich die Ionenhomöostase bzw. das Level an sekundären Botenstoffen in dem Wirtssystem durch Licht modulieren (Optogenetik, cf. Kapitel 1.3.18).

1.2.1 Bakteriorhodopsin und andere Ionenpumpen

Die auswärtsgerichtete H⁺-Pumpe Bakteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum*^A ist das am besten untersuchte Membranprotein der Welt und katalysiert den aktiven Transport (gegen den elektrochemischen Gradienten) von Protonen unter anaeroben Wachstumsbedingungen. Der gebildete Protonengradient an der Zellmembran wird von ATPasen zur ATP-Synthese verwendet und ermöglicht dem Halobakterium den energetischen

^A Früher unter der Gattungsbezeichnung *Halobacterim halobium* bekannt.

Haushalt auch ohne Zellatmung zu decken (Oesterhelt & Stoeckenius 1971; Racker & Stoeckenius 1974; Michel & Oesterhelt 1976). Während des H^+ -Transports durchläuft BR eine Reihe von kurzlebigen Spezies (Intermediaten), welche sich mithilfe von optischen Methoden z.B. UV-vis-, Infrarot- und Raman-Spektroskopie untersuchen lassen (Abbildung 3A).

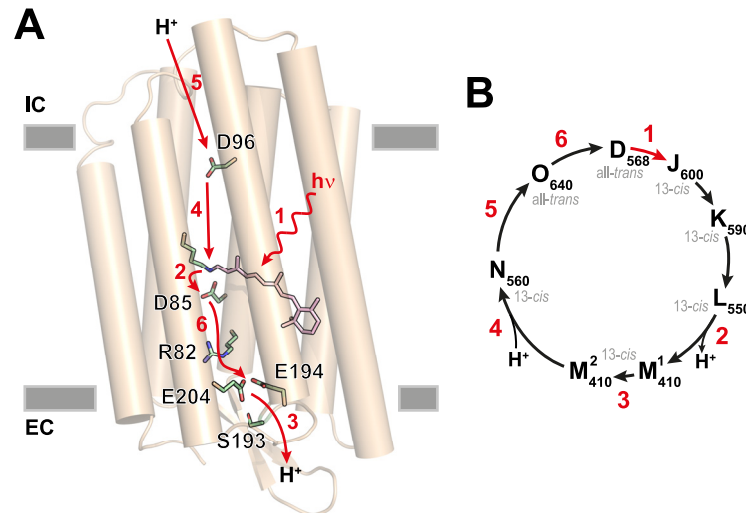


Abbildung 3: Vektorieller Protonentransport und Photozyklus in Bakteriorhodopsin. A) Die einzelnen Schritte der Protonentranslokation von der intrazellulären (IC) zur extrazellulären (EC) Seite in BR (PDB: 1iw6) sind skizziert. Absorption eines Photons und Isomerisierung des Retinal-Chromophors (1). Übertragung des Protons der Retinal Schiffischen Base (RSB) zum primären Protonakzeptor D85 (2). Abgabe eines Protons von der *proton release group* (PRG: E194, E204 & S193) nach EC (3). Re protonierung der RSB durch den Protonendonator D96 (4). Aufnahme eines intrazellulären H^+ von D96 (5). Protonentransfer von D85 zur PRG (eventuell über R82) (6). **B)** Nach Photoisomerisierung von all-*trans*- zu 13-*cis*-Retinal (roter Pfeil) durchläuft BR eine Vielzahl von Intermediaten (abgekürzt mit Buchstaben) mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima (Subskript, in nm). De- (2) und Re protonierung (4) der RSB bewirken große spektrale Verschiebungen. Re isomerisierung erfolgt im Übergang von N₅₆₀ nach O₆₄₀. Photozyklus adaptiert aus Oesterhelt (1998) und Ernst *et al.* (2014).

Die lichtinduzierte sequentielle Kaskade (Photozyklus) beinhaltet neben Veränderungen am Chromophor, auch Protonentranslokationen innerhalb des gesamten Proteins. Um eine passive Rückdiffusion in Richtung Cytoplasma zu unterbinden, erfordert es einer hocheffizienten räumlichen Trennung der einzelnen Reaktionszentren. Infolge der Isomerisierung der prosthetischen Gruppe (1) ändert sich der pK_s -Wert der protonierten Retinal Schiffischen Base (RSB) und das gebundene Proton wird auf den in der Nähe befindlichen primären Protonakzeptor D85 übertragen (2) (Abbildung 3A, B). Anschließend wird unter physiologischen Bedingungen ein H^+ von zwei Glutamaten (E194 & E204), der so genannten *proton release group* (PRG), zur extrazellulären Seite abgegeben (3). Es folgt die Re protonierung der RSB durch D96 (Protonendonator) (4), welches daraufhin ein H^+ von der intrazellulären Seite bindet (5). Der letzte Schritt (6) beinhaltet die Re protonierung der PRG durch den primären Akzeptor D85, wobei die Beteiligung von R82 an diesem Protonentransferschritt noch diskutiert wird (Luecke *et al.* 1999a; Luecke *et al.* 1999b; Lanyi 2006; Wolf *et al.* 2008; Freier *et al.* 2011). Die einzelnen Protonentransferprozesse sowie die Isomerisierung (1) und Re isomerisierung (5) korrelieren mit Verschiebungen der Chromophorabsorption des Proteins

(Absorptionsmaximum (λ_{max}) indiziert durch Subskript), welche mittels transienter bzw. ultraschneller UV-vis-Spektroskopie verfolgt werden können (Abbildung 3B).

Weitere Protonenpumpen wurden aus marinen Proteobakterien (Proteorhodopsin, PR) isoliert (Béjà *et al.* 2000; Béjà *et al.* 2001). In 2016 wurde eine H⁺-Pumpe aus dem Tiefseebakterium *Parvularcula oceani* identifiziert, welche entgegen BR und PR einen einwärtsgerichteten Transport katalysieren soll (Inoue *et al.* 2016). Ein Vertreter aus dieser neu entdeckten Klasse (Xenorhodopsin aus dem Nanohaloarchaeon *Nanosalina* sp. J07AB43) konnte vor Kurzem sogar kristallisiert werden (Shevchenko *et al.* 2017).

Das neben BR am längsten bekannte mikrobielle Rhodopsin ist das Halorhodopsin (HR), welches einen einwärtsgerichteten Chlorid-Transport katalysiert (Matsuno-Yagi & Mukohata 1977; Schobert & Lanyi 1982). Innerhalb der letzten Jahre wurden auch auswärtsgerichtete Na⁺-Pumpen wie z.B. KR2 aus *Krokinobacter eikastus* gefunden und strukturellen sowie dynamischen Untersuchungen unterzogen (Inoue *et al.* 2013; Kato, Inoue *et al.* 2015; Gushchin *et al.* 2015).

1.2.2 Rhodopsine in *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Rahmen von Genomanalysen wurden insgesamt zwölf verschiedene Rhodopsine in *C. reinhardtii* entdeckt, die in aufsteigender Reihenfolge Cop1 - 12 (engl. *Chlamydomonas opsin-related protein*, kurz: Chlamyopsin) benannt wurden (Deininger *et al.* 1995; Kateriya *et al.* 2004; Greiner 2015; Greiner *et al.* 2017). Die Funktion der alternativen Spleißvarianten Cop1 (236 AS) und Cop2 (243 AS) ist bis zum heutigen Zeitpunkt immer noch ungeklärt. Sie weisen eine gewisse Sequenzhomologie zu Invertebratenopsinen auf (Kateriya *et al.* 2004) und es wurde postuliert, dass sie in die Regulation und Assemblierung von Photosystem-1 involviert seien (Ozawa *et al.* 2009).

Die Gene von Cop3 und Cop4^B kodieren für die im Kapitel 1.3 ausführlicher behandelten Kanalrhodopsine (engl. *channelrhodopsins*, ChRs). Cop5 bis Cop12 besitzen neben der Rhodopsindomäne auch einen (sehr) ausgedehnten C-Terminus (Cop9: ~ 2300 AS), welcher innerhalb desselben Proteins für eine direkte Signalweiterleitung sorgt. Die langen C-Termini kodieren unter anderem für verschiedene Histidin-Kinasen, einen Response-Regulator, eine SAM-Domäne (engl. *sterile alpha motif*), eine Transposase (*tnp2*) sowie eine Adenylat- bzw. Guanylatcyclase als Effektor-Einheiten (Kateriya *et al.* 2004; Hegemann 2008; Greiner *et al.* 2017). Als Antwort für einen entsprechenden Lichtstimulus werden innerhalb der Alge zyklische Nukleotide (cAMP bzw. cGMP, zyklisches Adenosin- bzw. Guanosinmonophosphat) generiert, welche als sekundäre Botenstoffe (engl. *second messengers*) diverse intrazelluläre Prozesse initiieren

^B Nach Charakterisierung der Kanalfunktion in Chop1 (engl. *channelopsin*) und Chop2 umbenannt. Des Weiteren auch als CSRA (engl. *Chlamydomonas sensory rhodopsin*) und CSRB bekannt (Sineshchekov *et al.* 2002).

können. In spektroskopischen Untersuchungen der Rhodopsindomäne von Cop5 (in Histidin-Kinase-Rhodopsin-1 (HKR1) umbenannt) werden je nach Vorbelichtung zwei thermisch stabile Zustände (Rh-UV, $\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$ & Rh-BI, $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$) des Proteins populiert. Es wurde daher angenommen, dass HKR1 infolge von UV-A Strahlung bestimmte Entwicklungsprozesse in Gang setzen kann (Luck *et al.* 2012; Luck *et al.* 2015).

1.2.3 Enzymrhodopsine

Neben Pumpen und Kanälen haben sich aber auch einige andere retinalbasierte Photorezeptoren entwickelt, welche keinen (signifikanten) H^+ -Transport induzieren, sondern andere Funktionen steuern. So aktivieren die lichtinduzierten Konformationsänderungen in den Sensorischen Rhodopsinen SRI und SRII ^c aus *Halobacterium salinarum* eine Wechselwirkung mit dem Transducer Protein Htr (engl. *halobacterial transducer of rhodopsin*), welches eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzt. Diese steuert die Direktionalität des Flagellenapparats. Abhängig von der einstrahlenden Lichtfarbe ist eine positive (grün und gelb; $\lambda_{\max}(\text{SRI}) = 587 \text{ nm}$) bzw. negative Phototaxis (blau; $\lambda_{\max}(\text{SRII}) = 487 \text{ nm}$) zu beobachten (Bogomolni & Spudich 1982; Chen & Spudich 2002; Spudich 2006). Dieses Zusammenspiel der einzelnen Lichtqualitäten dirigiert die halophilen Bakterien zu Orten mit Lichtverhältnissen optimal für die Funktionalität von BR.

In 2014 wurde eine im Vergleich zu Cop5, Cop6 und Cop8 - 10 (Greiner *et al.* 2017) deutlich kürzere rhodopsingekoppelte Guanylatcyclase (626 AS) aus dem Pilz *Blastocladiella emersonii* entdeckt, welche nach Lichtabsorption die Produktion von cGMP beeinflusst. Die Veränderung des cGMP-Levels kontrolliert in den Zoosporen die Schlagrichtung des Flagellenapparats und führt so zu einer phototaktischen Antwort (Avelar *et al.* 2014). Die Fähigkeit, mit Licht die intrazellulären cGMP-Konzentrationen zu steuern, wurde daraufhin in optogenetischen Experimenten demonstriert (Scheib *et al.* 2015; Gao *et al.* 2015).

Als weiteres Zwei-Komponenten-System wurde eine Rhodopsin-Cyclonukleotid-Phosphodiesterase (704 AS) aus dem Organismus *Salpingoeca rosetta* (Choanoflagellat) charakterisiert (Yoshida *et al.* 2017; Lamarche *et al.* 2017). Mithilfe eines solchen optogenetischen Werkzeugs ließe sich der Abbau der sekundären Botenstoffe cAMP bzw. cGMP innerhalb fremden Gewebes durch Licht induzieren.

^c Auch als *pharaonis* Phoborhodopsin bekannt, da es auch aus *Natronomonas pharaonis* isoliert wurde und photophobes Verhalten kontrolliert.

1.3 Kanalrhodopsine

1.3.1 Allgemeines

Bereits Anfang bzw. Mitte der 80er Jahre wurde von Ken Foster und Kollegen ein Zusammenhang der Lichtwahrnehmung der motilen unizellularen Frischwasseralge *Chlamydomonas reinhardtii* und einem retinaltragenden Protein (Rhodopsin) prognostiziert (Foster & Smyth 1980; Foster *et al.* 1984). Dieser Verdacht konnte knapp 10 Jahre später durch elektrophysiologische Messungen an zellwanddefizienten *C. reinhardtii*-Zellen erhärtet werden (Harz & Hegemann 1991), jedoch erfolgte die funktionelle Eingruppierung der zugrunde liegenden Rhodopsine als lichtgesteuerte Ionenkanäle erst weitere 10 Jahre später (Nagel *et al.* 2002; Nagel *et al.* 2003). Die Kanalrhodopsine (ChRs) sind in der Plasmamembran oberhalb eines carotenoidreichen Organells, dem Augenfleck, lokalisiert (Suzuki *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2006; Berthold *et al.* 2008; Engel *et al.* 2015). Das Zusammenspiel der lichtsensitiven Proteine mit dem als Reflektor fungierenden Augenfleck ermöglicht der Alge die Richtung des einfallenden Lichts, sowie deren Intensität zu detektieren und sich mithilfe koordinierter Geißelschläge in Richtung bzw. entgegen der Lichtquelle zu manövrieren (positive bzw. negative Phototaxis) (Berthold *et al.* 2008).

Kanalrhodopsin-1 (ChR1) und Kanalrhodopsin-2 (ChR2) aus *C. reinhardtii* sind aus ca. 700 Aminosäuren (CrChR1: 712 AS; CrChR2: 737 AS) aufgebaut, wobei die ersten 100 AS die N-terminale extrazelluläre Domäne bilden. Es schließt sich ein ca. 200 AS großer membranständiger Teil an, welcher von der ausgedehnten C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (~400 AS) gefolgt wird. Der Transmembranteil bindet den Cofaktor Retinal kovalent über ein konserviertes Lysin in H7 und wird daher zumeist als Rhodopsindomäne bezeichnet. Diese besteht zum größten Teil aus sieben transmembranen α -Helices und konserviert die Kanalfunktion.

Die meisten bis dato identifizierten ChRs sind passive Kationenkanäle und leiten hauptsächlich Protonen, aber im geringeren Maße auch mono- und divalente Kationen ($H^+ \gg Li^+ > Na^+ > K^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+}$) (Nagel *et al.* 2003; Berthold *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009; Schneider *et al.* 2015). Dreizehn Jahre nach der Identifizierung der lichtgesteuerten Kationenkanäle wurde auch das entsprechende Pendant, lichtgesteuerte Anionenkanäle (ACRs) in *Cryptophyceae* (*Guillardia theta* & *Proteomonas sulcata*) identifiziert (Govorunova *et al.* 2015; Wietek *et al.* 2016; Govorunova *et al.* 2016). Auch diese sind permissiv und transportieren eine ganze Bandbreite von Anionen ($NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^- > SO_4^{2-}$) (Govorunova *et al.* 2015). Beide ChR-Varianten wurden in zahlreichen optogenetischen Anwendungen genutzt und werden in einem gesonderten Abschnitt (*cf.* Kapitel 1.3.18) behandelt.

Der Augenfleck in *C. reinhardtii* beheimatet ca. 10.000 - 120.000 ChRs (Melkonian & Robenek 1980; Beckmann & Hegemann 1991; Govorunova *et al.* 2004; Berthold *et al.* 2008), wobei jeder Kanal nur 10 - 100 Ladungen pro Lichtpuls transportiert (Harz *et al.* 1992; Hegemann 2008). Auch wenn die berechnete unitäre Leitfähigkeit von 30 - 700 fS (Nagel *et al.* 2003; Bamann

et al. 2008; Lin *et al.* 2009; Feldbauer *et al.* 2009) im Vergleich zu anderen Ionenkanälen ziemlich gering erscheint, ist zumindest in der Alge kein Bedarf für eine weitere chemische Signalamplifikation (Harz *et al.* 1992; Hegemann 2008). Da CrChR1 ($\lambda_{\text{max}} = 463 - 505 \text{ nm}$, pH 4.5 - 8) (Berthold *et al.* 2008) häufiger als CrChR2 ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ \& } 470 \text{ nm}$) (Ritter *et al.* 2008) im Augenfleck vertreten ist (Govorunova *et al.* 2004; Berthold *et al.* 2008), trägt es hauptsächlich zum Aktionsspektrum ($\lambda_{\text{max}} \sim 500 \text{ nm}$) der Photomotilität unter hohen Lichtintensitäten bei (Nultsch *et al.* 1971).

1.3.2 Struktur und Funktion

Erste Einblicke in die Gesamtarchitektur von CrChR2 lieferten kryostatische elektronenmikroskopische Bilder von 2D-Kristallen einer Auflösung von 6 Å (Müller *et al.* 2011). In diesen liegt CrChR2 (hauptsächlich Rhodopsindomäne: 1 - 315 AS) als sehr stabiles symmetrisches Dimer von jeweils sieben transmembranen Helices vor, wobei die enorme Stabilität mit Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Protomeren (H3 und H4) erklärt wurde.

In 2012 wurde dann die erste hochaufgelöste Kristallstruktur des Dunkelzustands der Kanalrhodopsin-Chimäre (C1C2) bestehend aus CrChR1 (H1 - H5) und CrChR2 (H6 - H7) publiziert (Kato *et al.* 2012). Die zur Kristallisation verwendete Variante besteht aus 356 AS und besitzt neben der N-terminalen Domäne (1 - 83 AS), die membranständige Rhodopsindomäne (84 - 317 AS) sowie einen verkürzten C-Terminus (318 - 356 AS). Die ersten 23 AS des N-Terminus dienen dem co-translationalen Proteintransport als Signalsequenz und werden nach der Prozessierung abgeschnitten. Sieben transmembrane Helices bilden die Rhodopsindomäne und sind über drei intra- sowie drei extrazelluläre Loops (ICL bzw. ECL) miteinander verbunden. Aufgrund der Flexibilität und der damit verbundenen strukturellen Heterogenität konnten einige Bereiche, u.a. 24 - 48 AS, 110 - 117 AS (ICL1) und 343 - 356 AS, in der Röntgenkristallstruktur nicht aufgelöst werden. Wie bereits in der beschriebenen elektronenmikroskopischen Studie zu sehen war, liegt C1C2 in kristalliner Form als Homodimer vor und die beiden Protomere sind eng miteinander verknüpft. Dabei bilden zum einen drei Cysteine (C66, C73 & C75; nicht konserviert, C34 & C36 in CrChR2) im N-Terminus Disulfidbrücken zum komplementären Protomer und zum anderen stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen H3/H4' und H4/H3' die Dimer-Struktur. Eine augenscheinliche Besonderheit bildet die longitudinale Ausdehnung der H7, welche sich 18 Å in das Zellinnere erstreckt (Abbildung 4A).

Die Helixfaltung von C1C2 weist strukturelle Übereinstimmungen mit BR auf, zeigt jedoch gewisse Unterschiede in dem N- und C-terminalen Proteinsegment, der ausgedehnten H7 sowie der axialen Ausrichtung der porenbildenden α -Helices 1, 2, 3 und 7. Durch eine horizontale Auswärtsorientierung der extrazellulären Enden von H1, H2, H3 und H7 wird eine extrazelluläre Kavität geschaffen, in welche Wasser einfließen könnte (Extrazellulärer Halbkanal) (Abbildung 4A, E). Tierische Rhodopsine wie bovines Rhodopsin (bR) zeigen wenig bis gar keine strukturelle Homologie (Kato *et al.* 2012).

Bemerkenswert ist das hohe Auftreten von negativ geladenen Aminosäuren (E82, E83, E90, E97 & E101 in *CrChR2* sowie E87 (*CrChR2*: A48) und D142 (*CrChR2*: K103) in *CrChR1*) innerhalb der ersten 100 bzw. 150 AS, welchen eine besondere Rolle beim Ionentransport sowie bei der Ionenselektivität zugeschrieben wird (*cf.* Kapitel 1.3.3, 1.3.4 & 1.3.5).

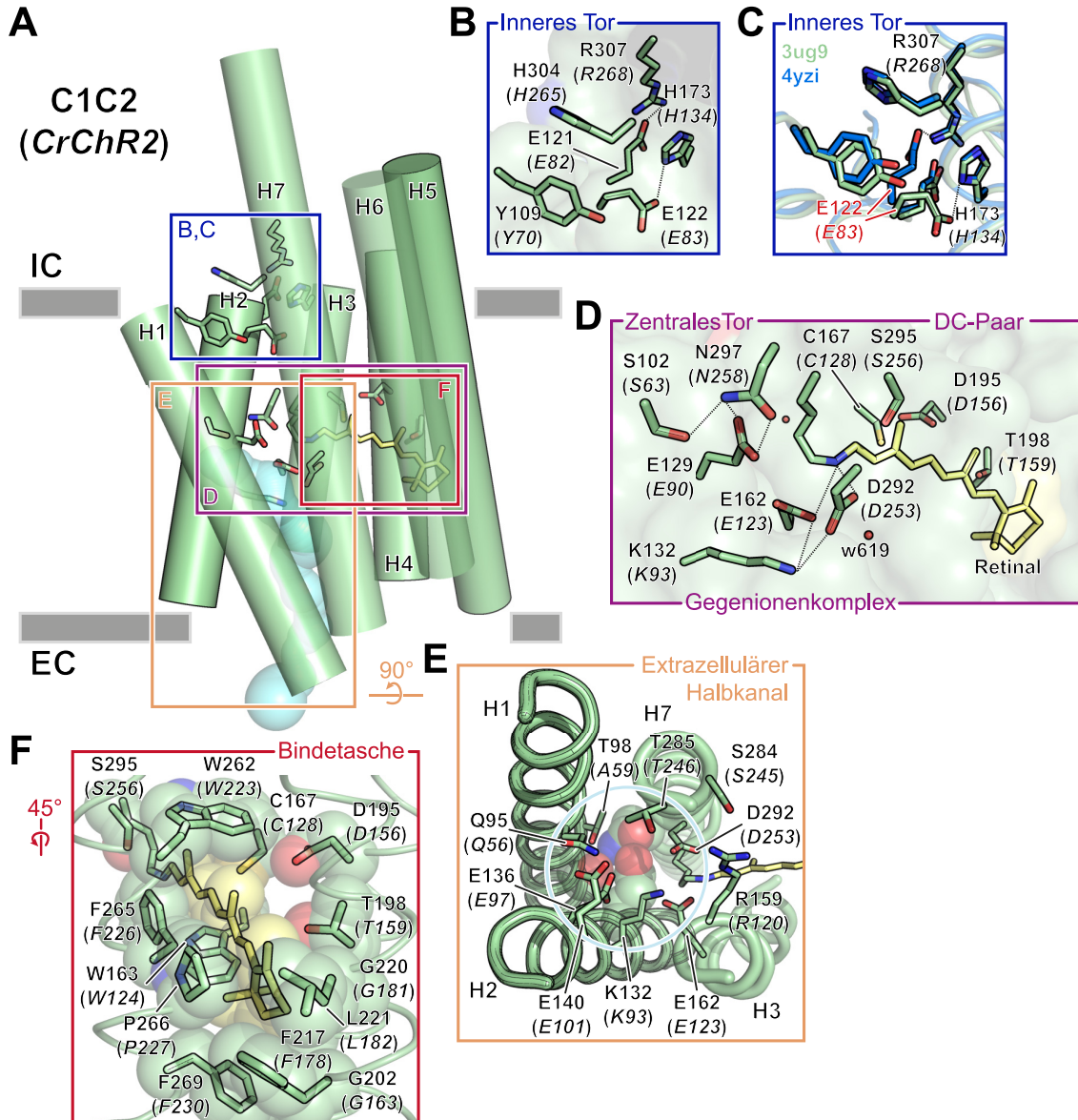


Abbildung 4: Struktur der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2. **A)** Modell der Rhodopsindomäne von C1C2 in seiner geschlossenen Konfiguration (PDB: 3ug9). Die Kanalpore zwischen H1, H2, H3 und H7 ist blockiert durch zwei räumliche Restriktionen in Richtung des Cytoplasmas (Inneres (B) und Zentrales Tor (D)). Zur extrazellulären Seite ist der Kanal weit geöffnet und weist eine ausgedehnte Kavität auf (Extrazellulärer Halbkanal, *hellblau*, MOLE 2.0). Nomenklatur in *CrChR2* in Klammern. **B)** Vergrößerung des Inneren Tors. **C)** Inneres Tor in C1C2 (PDB: 3ug9, *grün*) und C1C2-GA (PDB: 4yzi, *blau*). Die saure Aminosäure E122 ist in den beiden Strukturen unterschiedlich orientiert. **D)** Zentrales Tor, DC-Paar sowie Gegenionenkomplex. **E)** zeigt den extrazellulären Halbkanal mit Blick von der extrazellulären Seite. Aufgrund der vielen geladenen sauren Aminosäuren, welche die Kanalinnere säumen, bildet sich eine elektronegative Pore. Zentrales Tor (S102, E129 & N297) in Kalottendarstellung. **F)** Hydrophobe Bindetasche des Retinal-Cofaktors.

1.3.3 Kanalpore

Die transmembranen Helices 1, 2, 3 und 7 in C1C2 bilden in ihrem Zwischenraum eine elektronegative Pore, welche von einer Vielzahl von negativ geladenen Aminosäuren, vor allem aus H2 (E121, E122, E129, E136 und E140), umgeben wird (Abbildung 4B, D, E) (Kato *et al.* 2012). Die heptadische Periodizität ($n+7$) von einigen Glutamaten wie E122, E129 und E136 ließ bereits vor Veröffentlichung der Röntgenstruktur eine helikale Anordnung (3_{10} α -Helix) und die Bildung eines hydrophilen Milieus innerhalb des Proteins erahnen (Suzuki *et al.* 2003; Ruffert *et al.* 2011; Watanabe *et al.* 2012). Der vermutete Ionenkanal ist zu der extrazellulären Seite geweitet und bildet eine ausgedehnte Kavität mit einem Durchmesser von 8 Å (Extrazellulärer Halbkanal, Abbildung 4A, E). Elektrophysiologische Messungen an E136 bzw. deren homologe Reste in CrChR2 (E97) und Chrimson (E139) belegten ihre funktionelle Relevanz in Bezug auf den Ionentransport (Sugiyama *et al.* 2009; Ruffert *et al.* 2011; Kato *et al.* 2012; Tanimoto *et al.* 2013; Vierock *et al.* 2017). Des Weiteren führte die Substitution der basischen Aminosäure R159 (R120 in CrChR2) zu einer drastischen Reduktion des Kanalstroms, was die Autoren mit einer entscheidenden Rolle bei der Bildung des extrazellulären Vestibüls rechtfertigten (Kato *et al.* 2012; Plazzo *et al.* 2012; Li *et al.* 2014).

In der dunkeladaptierten Struktur von C1C2 ist der Ionentransportweg in Richtung des Cytoplasmas durch zwei strukturelle Konstriktionen blockiert. Eine ist in der Nähe der RSB (Zentrales Tor) und die andere nahe der intrazellulären Seite (Inneres Tor) verortet. Die beiden räumlichen Blockaden und deren Funktionen werden im Folgenden erörtert (*cf.* Kapitel 1.3.4 & 1.3.5).

1.3.4 Zentrales Tor

Im geschlossenen Zustand schnürt das Zentrale Tor den extrazellulären Halbkanal im Zentrum der Rhodopsindomäne ab und verhindert so den Wassereinfluss in Richtung des Cytoplasmas (Kato *et al.* 2012; Takemoto *et al.* 2015). Es besteht im Wesentlichen aus den drei Aminosäuren S102, E129 und N297 in C1C2 (S63, E90 & N258 in CrChR2), welche über interhelikale Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 4D). Substitutionen der einzelnen Reste beeinflussen die Stromamplitude, die Kinetiken sowie die Ionenselektivität (Ruffert *et al.* 2011; Plazzo *et al.* 2012; Eisenhauer *et al.* 2012; Wietek *et al.* 2014; Takemoto *et al.* 2015). Auf Basis der semi-empirischen Vorhersagesoftware PROPKA (H. Li *et al.* 2005; Bas *et al.* 2008; Olsson *et al.* 2011) wurde ein pK_s -Wert von 9.31 für E129 in C1C2 (E90 in CrChR2) bestimmt, d.h. bei neutralem pH liegt die Aminosäure in protonierter Form vor (Kato *et al.* 2012). Zahlreiche FTIR-Studien haben nachgewiesen, dass E90 in CrChR2 innerhalb des Photozyklus deprotoniert wird und/oder eine H^+ -Brückenbindungsänderung erfährt (Ritter *et al.* 2008; Radu *et al.* 2009; Eisenhauer *et al.* 2012; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013; Kuhne *et al.* 2015). Auch wenn der konkrete Zeitpunkt der Deprotonierung immer noch kontrovers diskutiert wird, legen die verringerten Kanalströme der E129- (E90-) Mutanten innerhalb elektrophysiologischer Messungen (Ruffert *et al.* 2011; Eisenhauer *et al.* 2012; Kato *et al.* 2012; Takemoto *et al.* 2015)

nahe, dass die negative Ladung des deprotonierten Glutamats im offenen Zustand einen wichtigen Beitrag für den Kationentransport leisten könnte. Ob die geringeren Photoströme in den Mutanten allerdings der fehlenden attraktiven Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Glutamat und den passierenden Kationen oder/und einer veränderten Ionenselektivität geschuldet sind, blieb ungeklärt.

Obwohl ChRs hauptsächlich Protonen leiten ($P_{H^+}/P_{Na^+} = 4 \times 10^5 - 1 \times 10^7$) (Nagel *et al.* 2003; Berndt *et al.* 2010; Kleinlogel, Feldbauer *et al.* 2011; Vierock *et al.* 2017), sind sie auch permissiv für einige einwertige aber auch zweiwertige Kationen. Da die einzelnen Ladungsträger unterschiedlich große Ionenradien besitzen und verschieden große Hydrathüllen ausbilden, widerspricht dies einer definierten Bindungsstelle. Stattdessen befürwortet es eine transient gefüllte Wasserpore. Durch Ladungsneutralisation (C γ ChR2-E90Q) bzw. -inversion (C γ ChR2-E90K/R) innerhalb des Zentralen Tors lässt sich die Selektivität zugunsten von Na⁺ (Eisenhauer *et al.* 2012) bzw. Anionen (Wietek *et al.* 2014) verschieben. Aufgrund dessen wird dem Zentralen Tor, vor allem E129, eine Funktion als Ionenfilter zugewiesen. Da die Bildung einer transmembranen Ionenpore in der geschlossenen Konfiguration durch das Zentrale Tor unterbunden wird, ist die Öffnung dieser räumlichen Barriere ein wichtiger Teil der Photoaktivierung (*cf.* Kapitel 1.3.16).

1.3.5 Inneres Tor

Ein Arrangement aus sechs Aminosäuren (Y109, E121, E122, H173, H304 & R307 in C1C2) nahe der intrazellulären Seite bildet die zweite räumliche Barriere innerhalb des vermuteten Ionenkanals (Kato *et al.* 2012) und wurde als eine von zwei möglichen Na⁺-Bindestelle vorhergesagt (Watanabe *et al.* 2013). Das so genannte Innere Tor wird durch zwei interhelikale Wechselwirkungen ausgehend von E121 und E122 (E82 & E83 in C γ ChR2) stabilisiert, wobei die beiden Röntgenstrukturen aufgrund der unterschiedlichen Orientierung von E122 verschiedene Interaktionspartner suggerieren (Abbildung 4B, C). In der Kristallstruktur von 2012 (*Protein Data Base*, PDB: 3ug9, pH 5.8) zeigt die Carboxylgruppe von E122 (H2) in Richtung des Proteinkerns und könnte so eine Wasserstoffbrücke zu H173 (H3) ausbilden. Im Gegensatz dazu ist die Glutaminsäure in der blau-verschobenen C1C2-GA Mutante (PDB: 4yzi, pH 7.0) in Richtung des Cytoplasmas orientiert und eine Salzbrücke zu R307 (H7) wäre denkbar. Die andersartige Ausrichtung von E122 könnte den variierenden Kristallisationsbedingungen (pH-Wert) und einem ungleichen Protonierungsgrad von E122 zugrunde liegen. Eine Hypothese, welche gut mit dem für E122 bestimmten pK_s-Wert von 5.4 in der C1C2-GA Mutante zu vereinbaren wäre (Kato, Kamiya *et al.* 2015).

Im Rahmen von elektrophysiologischen Messungen wurde H134 in C γ ChR2 (H173 in C1C2) als weitere Determinante für die Ionenselektivität von ChRs ausgemacht (Gradmann *et al.* 2011; Schneider 2014). Mutationen (Alanin & Glutamin) der beiden konservierten Glutaminsäuren in C1C2 sowie in C γ ChR2 verursachen geringere Kanalströme und eine Verlangsamung der Kanalschließung im Vergleich zum Wildtyp (Sugiyama *et al.* 2009; Takemoto *et al.* 2015; Wietek *et al.* 2015). Auch in H134R war eine retardierte Kinetik zu verzeichnen,

dennoch avancierte sie zu einer „*gain of function*“-Mutante, da sie neben einem geringeren Ausmaß an Inaktivierung und einer reduzierten H⁺-Leitfähigkeit auch ein erhöhtes Expressionslevel zur Folge hat (Nagel *et al.* 2005; Lin *et al.* 2009; Stehfest & Hegemann 2010).

1.3.6 Retinal-Bindetasche

Fünf aromatische Aminosäuren (W163, F217, W262, F265 & F269 in C1C2) bilden eine hydrophobe Bindetasche für den all-*trans*-Retinal-Chromophor (Abbildung 4F). Der β -Ionon-Ring wird durch mehrere Reste (T198, G202, G220, L221, P266 & F268 in C1C2) in seiner 6-*s-trans*-Konfiguration verankert (*cf.* Abbildung 15C) (Kato *et al.* 2012). Die polaren Reste C167 und D195 bilden das im anschließenden Abschnitt behandelte DC-Paar (*cf.* Kapitel 1.3.7). Neben den letztgenannten Aminosäuren haben auch T198 und S295 einen polaren Charakter und beeinflussen das Absorptions- bzw. Aktionsspektrum (*cf.* Kapitel 1.3.17). Die T159C-Mutation in C γ ChR2 (T198 in C1C2) verursacht größere Kanalströme (Berndt *et al.* 2011) und eine erhöhte Bindungsaffinität für den Cofaktor im Vergleich zum Wildtyp (Ullrich *et al.* 2013). Substitutionen des Threonins 159 mit aromatischen Aminosäuren (Y, W, F) führen hingegen zu einer Stabilisierung des Apoproteins (Ullrich *et al.* 2013).

1.3.7 DC-Paar

In der Retinal-Bindetasche befinden sich drei polare Aminosäuren (C167, D195 & T198 in C1C2; C128, D156 & T159 in C γ ChR2) in der Nähe des Chromophors (Abbildung 4D), welche bei Mutagenese erhebliche kinetische Veränderungen nach sich ziehen. Mutanten des so genannten DC-Paars verursachen einen 2 - 150.000fach langlebigeren leitenden Zustand im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 2) und ermöglichen dadurch eine Depolarisation über Sekunden bis hin zu Minuten als Folge eines einzigen blauen Lichtpulses, sowie Zelldepolarisation unter schwachem Hintergrundlicht (Berndt *et al.* 2009; Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011). Da der späte offene Zustand in C γ ChR2 (P₅₂₀, grün-absorbierend) im Vergleich zum Dunkelzustand (D₄₇₀, blau-absorbierend) spektral in den längerwelligen Bereich verschoben ist (*cf.* Abbildung 6C, D), kann mithilfe eines zweiten (grünen) Lichtpulses die Kanalschließung beschleunigt werden. Diese Fähigkeit erlaubt das An- bzw. Ausschalten des Kanalstroms mit blauem bzw. grünem Licht und war daher namensgebend für diese Klasse der Mutanten (engl. *step function opsin*, SFO).

Während in Analogie zu BR (T90 & D115) (Perálvarez-Marín *et al.* 2004; Joh *et al.* 2008) in früheren Studien eine interhelikale (H3 - H4) Wechselwirkung zwischen den beiden homologen Resten in C γ ChR2 im Dunkelzustand konstatiert wurde (Nack *et al.* 2010), suggeriert die hochaufgelöste Kristallstruktur ein anderes molekulares Arrangement. Der relative große Abstand der Thiolgruppe des Cysteins zu dem Carboxyl-Sauerstoff der Asparaginsäure von 4.4 bzw. 4.6 Å macht eine Wasserstoffbrückenbindung ziemlich unwahrscheinlich. Allerdings legt die Röntgenstruktur eine direkte Wechselwirkung der Mercaptogruppe von C167 mit dem

π -Elektronen-System des konjugierten Retinals nahe (Kato *et al.* 2012). QM/MM-Simulationen von CrChR2 auf Basis der C1C2-Kristallstruktur sagten eine indirekte Interaktion von C128 und D156 (C167 & D195 in C1C2) über ein verbrückendes Wassermolekül vorher (Watanabe *et al.* 2013). Jedoch wurde auch diese Möglichkeit in jüngsten Computersimulationen in Frage gestellt, welche weder eine direkte noch eine indirekte Wechselwirkung der beiden Reste in C1C2 beobachteten (VanGordon *et al.* 2017).

	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	H3										H4									
		C128										D156 T159									
PsChR2	442	109	L	T	C	P	V	113	137	T	S	D	L	G	G	I	C	144	<div><div><div></div><div>sauer</div></div><div><div></div><div>alkalisch</div></div><div><div></div><div>polar</div></div><div><div></div><div>neutral, unpolar</div></div></div>		
C1C2	470	165	L	T	C	P	V	169	193	V	S	D	I	G	T	I	V	200			
CrChR2	470	126	L	T	C	P	V	130	154	V	S	D	I	G	T	I	V	161			
Chronos	488	143	L	T	C	P	V	147	171	V	T	D	I	G	N	I	V	178			
DsChR1	490	181	L	S	C	P	V	185	209	V	S	D	I	G	T	I	V	216			
CaChR1	518	172	L	C	C	P	V	176	200	V	S	D	I	A	T	I	V	207			
ReaChR	527	166	L	T	C	P	V	170	194	V	S	D	V	G	C	I	V	201			
VcChR1	535	121	L	T	C	P	V	125	149	V	S	D	V	G	C	I	V	156			
C1V1	539	165	L	T	C	P	V	169	193	V	S	D	V	G	C	I	V	200			
Chrimson	584	168	L	S	C	P	V	172	196	V	S	C	V	G	M	I	V	203			
HsBR	551	88	F	T	T	P	L	92	113	G	A	D	G	I	M	I	G	120			

	sauer
	alkalisch
	polar
	neutral, unpolar

Abbildung 5: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren DC-Paaren. Nomenklatur von CrChR2 (farbige Zahlen). Farben symbolisieren den chemischen Charakter der jeweiligen Aminosäure (cf. Legende). Referenzen für Absorptions- bzw. Aktionspektren siehe Tabelle 5. PsChR2 (früher: PsChR, cf. Szundi *et al.* 2015), ChR2 aus *Platymonas* (*Tetraselmis*) *subcordiformis*, Protein-ID: AGF84747; C1C2, Chimäre von ChR1 und ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii*, PDB: 3ug9; CrChR2, ChR2 aus *C. reinhardtii*, Protein-ID: AAM15777 bzw. EDP06700; Chronos, ChR aus *Stigeoclonium helveticum*, Protein-ID: AHH02106; DsChR1, ChR1 aus *Dunaliella salina*, Protein-ID: AEY68833; CaChR1, ChR1 aus *Chlamydomonas* (*Chloromonas*) *augustae*, Protein-ID: AER58220; VcChR1, ChR1 aus *Volvox carteri*, Protein-ID: ABZ90901; ReaChR, Chimäre aus CrChR1 und VcChR1 & VcChR2, Protein-ID: AGT48260; C1V1(-25A), Chimäre aus CrChR1 und VcChR1, Protein-ID: AEL28923 (ohne E162T, V196I & G197A); Chrimson, ChR1 aus *Chlamydomonas noctigama*, Protein-ID: AHH02126; HsBR, Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*, PDB: 1iw6.

Es wurde angenommen, dass die räumliche Nähe der polarisierbaren Thiolgruppe von C128 in CrChR2 (C167 in C1C2) zum Chromophor die Reisoomerisierung von P₅₂₀ (13-*cis*) nach P₄₈₀ (all-*trans*) beschleunigen würde. Entsprechend würde eine Mutation an C128 eine verlangsamte bzw. im Extremfall blockierte Reisoomerisierung des Cofaktors induzieren und somit das Protein im leitenden Zustand (P₅₂₀) verweilen (Berndt *et al.* 2009). Allerdings bietet dieser Ansatz keine Erklärung für die verlangsamten D156-Mutanten und ist nicht in Einklang zu bringen mit der schnelleren Isomerisierung und Bildung des primären Photoprodukts der C128T-Mutante in ultraschnellen Messungen (Scholz *et al.* 2012).

FTIR-Messungen an CrChR2 und einer Serie von Mutanten legten D156 (D195 in C1C2) als potentiellen Protonendonator für die Reprotonierung der RSB nahe (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013). Die Autoren postulierten weiterhin, dass die Wechselwirkung mit C128 den pK_s-Wert des Protonendonors D156 anheben würde. Entsprechend würde bei Mutagenese des DC-Paars (C128 oder D156) der pK_s-Wert des Protonendonors sinken und D156 würde, wenn nicht bereits Teil des Aminosäureaustausches, in einem breiteren pH-Bereich dissoziiert vorliegen. Als Konsequenz wäre in beiden Fällen die RSB-Reprotonierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und von einer anderen nichtproteinogenen Protonenquelle abhängig. Alternativ könnte der pK_s-Wert der RSB durch die Mutationen direkt reduziert werden und würde damit eine geringere Protonenaffinität bei neutralen Bedingungen aufweisen, so dass die Reprotonierung

erst später stattfinden würde (Bamann *et al.* 2010). Dieses Modell könnte allerdings nur die Langlebigkeit des deprotonierten P₃₉₀ erklären.

Tabelle 2: Kinetischer Einfluss von Mutationen des DC-Paars in Rhodopsinen. λ_{max} , Maximum des Aktions- bzw. Absorptionsspektrums; τ_{off} , Abklingkinetik des Kanalstroms nach der Belichtungsphase; P₅₂₀, später leitender Zustand in CrChR2; P₄₈₀, spätes Photointermediat in CrChR2 (*cf.* Abbildung 6B). Elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oozyten (1), an HEK293-Zellen (2) bzw. an Neuronen (3). UV-vis-Spektroskopie mit isoliertem Protein (4). nicht funktional (5) (Prigge 2012); sehr kleine Kanalströme (6) (Prigge 2012). Wenn der WT nicht unter den gleichen Belichtungsbedingungen vermessen wurde, wurde sich bei der Berechnung auf einen WT-Wert mit ähnlicher Illumination bezogen (7). Gewichtete (apparente) Abklingkinetik des M-Intermediates bei pH 6.5 (8).

Rhodopsin	Mutante	λ_{max} / nm	Belichtung	τ_{off} bzw. $P_{520} \rightarrow P_{480}$ / s	Verlangsamung ⁷	Referenz
CrChR2	wt		2 s, 450 nm	0.0119±0.0003	1.0	Berndt et al., 2009 ¹
	wt		10 ns, 470 nm	0.010±0.0008	1.0	Berndt et al., 2009 ³
	wt	470 ³	1 s, 500 nm	~0.010	1.0	Berndt et al., 2011 ¹
	wt		10 ns, 500 nm	~0.014	1.0	Berndt et al., 2011 ¹
	wt	465	0.3 s, 460 nm	0.0021±0.002	1.0	Prigge et al., 2012 ²
	wt		10 ns, 460 nm	0.0084±0.0003	1.0	Prigge et al., 2012 ¹
	wt	447/470	~ns, 456 & 477 nm	0.0085±0.001	1.0	Bamann et al., 2010 ⁴
	C128T		12.5 s, 450 nm	2±0.5	168	Berndt et al., 2009 ¹
	C128T		10 ns, 470 nm	1.8±0.3	180	Berndt et al., 2009 ³
	C128T	480	~ns, 456 & 477 nm	29±2.2	3412	Bamann et al., 2010 ⁴
	C128A		20 s, 450 nm	52±2	4370	Berndt et al., 2009 ¹
	C128A		10 ns, 470 nm	49±3.5	4900	Berndt et al., 2009 ³
	C128A	447/470	~ns, 456 & 477 nm	30±1.3	3529	Bamann et al., 2010 ⁴
	C128S		20 s, 450 nm	106±9	8908	Berndt et al., 2009 ¹
	C128S		10 ns, 470 nm	108±42	10800	Berndt et al., 2009 ³
	D156A	480	1 ms & 10 s, 473 nm	>150	>12605-15000	Bamann et al., 2010 ^{1,2}
	D156A		10 s, 470 nm	414	34790	Yizhar et al., 2011 ³
	D156A	480	~ns, 456 & 477 nm	300±4	35294	Bamann et al., 2010 ⁴
	D156C		20 s, 473 nm	76±12	7600	Dawydow et al., 2014 ¹
	D156N		9 min, 450 nm	2.83	238	Berndt, 2011 ²
	D156N		10 ns, 470 nm	2	200	Berndt, 2011 ²
	T159C	473 ³	1 s, 500 nm	~0.018	1.8	Berndt et al., 2011 ¹
	T159C		10 ns, 500 nm	~0.035	2.5	Berndt et al., 2011 ¹
	T159C	463	0.3 s, 460 nm	0.062±0.002	3.0	Prigge et al., 2012 ²
	T159C		10 ns, 460 nm	0.0271±0.0005	3.2	Prigge et al., 2012 ¹
	C128S-T159C	472±6	0.3 s, 470 nm	4±1.4	1905	Prigge et al., 2012; Prigge, 2012 ²
	C128S-D156A		10 s, 470 nm	1740	146218	Yizhar et al., 2011 ³
C1V1	wt	539±4 ²	2 ms, 540 nm	0.156±0.012	1.0	Yizhar et al., 2011 ³
	wt	539±4	0.3 s, 560 nm	0.130±0.017	1.0	Prigge et al., 2012 ²
	wt		10 ns, 560 nm	0.077±0.008	1.0	Prigge et al., 2012 ¹
	C167T	540±3	0.3 s, 560 nm	1.3±0.8	10	Prigge, 2012 ²
	C167S	537±4	0.3 s, 560 nm	4.4±2.2	34	Prigge, 2012 ²
	D195A ⁵		0.3 s, 560 nm	~0.086	0.7	Prigge et al., 2012
	D195N ⁶	542±4	0.3 s, 560 nm	0.086±0.043	0.7	Prigge, 2012 ²
	C198T	538±4	0.3 s, 560 nm	0.043±12	0.3	Prigge, 2012 ²
	wt	590/630	1 s, 610/630 nm	0.137±0.007	1.0	Lin et al., 2013 ²
	wt	532	5 s, 530 nm	0.181±0.022	1.0	Krause et al., 2017 ²
	wt	536	0.5 s, 530 nm	0.132±0.007	1.0	Kaufmann et al., 2017 ²
	wt	527	10 ns, 530 nm	0.151±0.002	1.0	Teil dieser Arbeit ⁴
	C168T	504	60 s, 505 nm	~ ms	-	Teil dieser Arbeit ⁴
	C168A		25 s, 530 nm	19.7±0.9	109	Krause et al., 2017 ²
	C168S		25 s, 530 nm	28.1±1.5	155	Krause et al., 2017 ²
	C168S	525	60 s, 530 nm	153.4±0.1	1016	Teil dieser Arbeit ⁴
	D196N	537	0.5 s, 530 nm	0.202±0.023	1.5	Kaufmann et al., 2017 ²
	D196N	523	10 ns, 530 nm	4.42±0.06	29	Teil dieser Arbeit ⁴
HsBR	wt	558	~9 ns, 532 nm	0.0030 ⁸	1.0	Perálvarez-Marín et al., 2004 ⁴
	T90A	548	~9 ns, 532 nm	0.0342 ⁸	11.4	Perálvarez-Marín et al., 2004 ⁴
	D115A	551	~9 ns, 532 nm	0.0135 ⁸	4.5	Perálvarez-Marín et al., 2004 ⁴

Als weitere molekulare Determinante für die Stabilisierung des leitenden Zustands in den C_rChR2-SFOs wurde T159 (T198 in C1C2) identifiziert. Während die Substitution gegen ein Cystein (T159C) die Abklingkinetik leicht verlangsamt ($\sim 2 - 3$ Mal, Tabelle 2) (Berndt *et al.* 2011; Prigge *et al.* 2012), induziert dieselbe Mutation auf Basis der stark retardierten C128S eine ~ 25 -fache Beschleunigung des Kanalschlusses (Prigge *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu beschleunigt die Einführung eines Threonins in die C_rChR1/V_rChR1-Chimäre C1V1 (C198T), in welchem nativ ein Cystein an der homologen Stelle konserviert ist (Abbildung 5), die Beschleunigung der Abklingkinetik (Prigge 2012). Dieses natürlich vorkommende Cystein in dem grün-aktivierbarem C1V1 erklärt somit, zum einen die geringe Lebenszeitverlängerungen der SFOs auf Basis von C1V1 und zum anderen, zumindest teilweise, den langsameren Kanalschluss von C1V1 gegenüber C_rChR2 (Tabelle 2).

1.3.8 Gegenionenkomplex

Neben der RSBH⁺ befinden sich zwei saure Aminosäuren (E162: 3.4 Å & D292: 3.0 Å in C1C2) und ein Wassermolekül (w619: 4.4 Å) sowie ein distales Lysin (K132: 6.4 Å), welches wahrscheinlich mit den beiden Carbonsäure-Seitenketten interagiert (Kato *et al.* 2012). In BR fungiert der so genannte Gegenionenkomplex, nach der Isomerisierung des Chromophors und der Abstraktion des H⁺ der Schiffischen Base, als Protonakzeptor (*cf.* Abbildung 3). Es wird dabei nach der Wahrscheinlichkeit, das dissoziierte Proton zu binden, zwischen primärem und sekundärem Akzeptor unterschieden. Diese hängt aber nicht nur von der räumlichen Nähe, sondern auch von dem jeweiligen Protonierungsgrad des Restes ab. Da in normalen Röntgenbeugungsexperimenten Protonen nicht sichtbar sind, bedient man sich alternativen Methoden um diesen abzuschätzen. Bei physiologischem pH-Wert von 7.4 liegen freie Monocarbonsäuren wie z.B. Essigsäure aufgrund ihres pK_s-Werts von 4.8 in deprotonierter Form vor. Im Gegensatz dazu kann sich die Dissoziationskonstante innerhalb eines Proteins drastisch ändern. Neben pH-Titrations an rekombinantem Protein bietet das bioinformatische Programm PROPKA (H. Li *et al.* 2005; Bas *et al.* 2008; Olsson *et al.* 2011) eine ungefähre Vorhersage für pK_s-Werte innerhalb eines Proteinensembles. Es berücksichtigt bei der semi-empirischen Prognose der Protonenaffinität einzelner Reste die jeweilige Proteinumgebung im kristallisierten Zustand bei gegebenem pH-Wert. Für C1C2 lieferte die PROPKA-Analyse für E162 einen pK_s-Wert von 5.83 und für D292 einen von 3.21 (Kato *et al.* 2012). Unter den durchgeführten Kristallisationsbedingungen (pH 5.8) könnte E162 also noch protoniert vorliegen und würde somit als Protonakzeptor ausscheiden. Diese Überlegung sowie der kürzere Abstand zur RSBH⁺ präferieren D292 als primären Akzeptor. Aufgrund der erheblichen Distanz zwischen dem geordneten Wassermolekül w619 und der RSBH⁺ von 4.4 Å scheint es höchst unwahrscheinlich, dass es zu einer direkten Wechselwirkung, sprich einem Protontransfer zwischen diesen Partnern kommt.

Weitere strukturunabhängige experimentelle Indizien für die Identifikation des bzw. der Protonakzeptoren liefern elektrophysiologische Messungen. Während der Photostrom in der C1C2-Mutante E162A nur um circa die Hälfte abnimmt, ist er in D292A kaum noch zu

detektieren (Kato *et al.* 2012), d.h. dass die Präsenz einer protonierbaren Seitenkette an der Position von D292 essentiell für die Kanalfunktion ist, währenddessen E162 (weil evtl. protoniert) in C1C2 nur einen geringeren funktionellen Beitrag leistet. Nichtsdestotrotz sollte hier berücksichtigt werden, dass sich in beiden Mutanten die Stromamplitude verringert, somit wäre auch eine partielle Protonierung von E162 durch die RSBH⁺ denkbar. Eine ähnliche Tendenz ist bei C γ ChR2 zu beobachten. Die neutrale Gegenionenmutante D253N (D292 in C1C2) zeigt sehr kleine Ströme (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013), wobei Substitutionen des E123 (E162 in C1C2) die Amplitude der lichtinduzierten Kanalströme weniger stark beeinflussen (Gunaydin *et al.* 2010). Da dieser Trend selbst in zwei grün-absorbierenden ChRs (Kanalrhodopsin-1 aus *Volvox carteri* (V γ ChR1) & *Chlamydomonas augustae* (CaChR1)) konserviert ist (Sineshchekov *et al.* 2013), lässt sich zumindest von elektrophysiologischer Seite der initial postulierten Zuordnung des primären Gegenions nicht widersprechen.

Mittels Hybrid-QM/MM-Rechnungen wurde für C1C2 ein anionisches D292 (D253 in C γ ChR2) und ein neutrales E162 (E123 in C γ ChR2) vorhergesagt, während für C γ ChR2 zwei geladene Seitenketten prognostiziert wurden (Watanabe *et al.* 2013). In 2013 lieferte eine detaillierte FTIR-Studie an C γ ChR2 und einer Reihe von Mutanten spektroskopische Evidenzen für die Funktion von D253 als primärem Protonakzeptor der RSBH⁺ (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013). Jedoch wurde diese Zuordnung zwei Jahre später durch weitere schwingungsspektroskopische Daten in Frage gestellt. Kuhne *et al.* beobachteten eine parallele Protonierung beider Gegenionen (E123 & D253) in C γ ChR2 und folgerten, dass beide Reste in individuellen Photozyklen als Akzeptor fungieren könnten (Kuhne *et al.* 2015). Letztere Hypothese wird durch eine aktuelle QM/MM-Studie unterstützt, in welcher C γ ChR2 einen heterogenen Grundzustand mit drei simultan vorliegenden RSBH⁺-Gegenionenpaaren aufweist. Neben den beiden bereits postulierten Konfigurationen (E123-RSBH⁺ & D253-RSBH⁺) wird die protonierte Schiffsbasis teilweise auch durch ein Wassermolekül stabilisiert. Im Rahmen der Rechnungen waren alle drei Arrangements nahezu gleich wahrscheinlich (Guo *et al.* 2016). Laut FTIR-Untersuchungen an C1C2 liegen beide aciden Aminosäuren im ionischen Zustand vor, wobei E162 die Funktion des primären Akzeptors inne hat (Ito *et al.* 2014). Letztgenannte Befunde werden durch jüngste Computersimulationen an C1C2 gestützt (VanGordon *et al.* 2017).

Anhand der teils diametral entgegengesetzten Resultate lässt sich kein allgemeingültiger Konsens für alle ChRs ableiten, obwohl das Gros für D253 bzw. sein homologes Pendant als primären Protonakzeptor votiert. Es stellt sich allerdings die Frage, ob diesem Anspruch aufgrund der Vielzahl von ChRs in der Natur überhaupt gerecht werden kann. Wahrscheinlich ist nur das biophysikalische Prinzip und nicht der konkrete Akteur in dieser Proteinklasse konserviert. Außerdem unterschieden sich zum Teil die experimentellen Bedingungen wie pH-Wert deutlich, was einen erheblichen Einfluss auf das Wasserstoffbrückennetzwerk bedeuten kann.

Die Position und Ladung der Gegenionen beeinflussen das Absorptionsverhalten der Rhodopsine. So führen viele Aminosäuresubstitutionen der zumeist geladenen Gegenionen zu Farbverschiebung der Chromophorabsorption (*cf.* Kapitel 1.3.17). Dabei kann das Ausmaß der

Verschiebung durch den Austausch in nicht ionisierbare Reste mit zu der Beurteilung der Gegenionen beitragen (cf. Tabelle 5).

Neben den spektralen Eigenschaften verursachen Mutationen im Gegenionenkomplex aber auch signifikante kinetische Änderungen. Durch Austausch der Glutaminsäure an Position 123 in CrChR2 durch Glutamin, Alanin und besonders Threonin beschleunigt sich sowohl die Öffnung als auch die Schließung des Ionenkanals drastisch. Die so genannten ChETA-Mutanten (engl. *channelrhodopsin-ET-accelerated*) finden aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften breite Anwendung in optogenetischen Experimenten, welche hohe Belichtungsfrequenzen benötigen (Gunaydin *et al.* 2010; Berndt *et al.* 2011; Prigge *et al.* 2012). Als Ursache für die Beschleunigung wurde eine direkte bzw. indirekte (über T127 und C128 in CrChR2) Destabilisierung der RSBH⁺ (Gunaydin *et al.* 2010) bzw. ein deprotoniertes E90 im Zentralen Tor (E129 in C1C2) im Dunkelzustand (vorgeöffneter Kanal) angeführt (cf. Kapitel 1.3.16) (Kuhne *et al.* 2015). Allerdings zeigt CrChR2-E123T innerhalb spektroskopischer Experimente eine verlangsamte Isomerisierung und spektrale Evolution der leitenden Intermediate P₃₉₀ und P₅₂₀ im Vergleich zum Wildtyp. Lediglich war ein achtfach schnellerer Zerfall des frühen P₂₅₀ und eine vierfach schnellere Rückkehr von P₄₈₀ in den Dunkelzustand der E123T-Mutante festzustellen (Scholz *et al.* 2012; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Für C1C2-D292A wurde eine vierfach langsamere Kanalöffnung beschrieben (Kato *et al.* 2012), was sich mit dem Nichtvorhandensein eines geeigneten, räumlich nahen Protonakzeptors im frühen Stadium des Photozyklus (P₅₀₀ → P₃₉₀) und der damit einhergehenden globalen Verlangsamung der Reaktionskaskade vereinbaren ließe.

Substitutionen von K132 in C1C2 (K132A; K93 in CrChR2) und der homologen Position in ChR2 aus *Platymonas subcordiformis* (P₃ChR2-K76F) führen zu einer beschleunigten Kanalschließung (C1C2: $\tau \sim 20$ ms, K132A: $\tau \sim 10$ ms; P₃ChR2: $\tau_1 = 10$ ms, $\tau_2 = 102$ ms; K76F: $\tau_1 = 4$ ms, $\tau_2 = 50$ ms) (Kato *et al.* 2012; Li *et al.* 2014). Die beschleunigten Kinetiken wurden mit einer Erhöhung der pK_s-Werte der E162- und D292-analogen Aminosäuren in Abwesenheit des distalen Lysins erklärt (Li *et al.* 2014).

1.3.9 C-Terminus

Die C-terminale Domäne hat eine Länge von ca. 400 - 600 AS und enthält eine Vielzahl von Methionin-Glycin- und Asparagin-Glycin-Tandems (bis zu 80 Stück in V₁ChR1) (Kianianmomeni *et al.* 2009). Dabei ist der ausgedehnte C-Terminus aus bis zu 40 % der kleinsten drei Aminosäuren (G, A & S) aufgebaut, welche ihm zwar eine wenig komplexe, aber dafür hoch flexible Anordnung verleihen. Die kurzen repetitiven Einheiten werden von drei hoch konservierten Regionen flankiert, welche in CrChR1/2 und V₁ChR1/2 ähnliche Abstände zueinander aufweisen. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die konservierten Regionen in die subzelluläre Lokalisation sowie Befestigung innerhalb des Augenfleck-Organells von *Chlamydomonas* involviert sind (Kreimer 2009; Kianianmomeni *et al.* 2009; Mittelmeier *et al.* 2011). Diese zelluläre Verankerung könnte einer ungerichteten Diffusion innerhalb der

Plasmamembran entgegenwirken und die lichtsensitiven Proteine an ihrem bevorzugten Aufenthaltsort oberhalb des Augenflecks fixieren.

Zusätzlich tragen die meisten ChRs Phosphorylierungsstellen im ersten cytoplasmatischen Loop 54 - 55 AS nach der Rhodopsindomäne (z.B. S358, T373 & S376 in CrChR1; S321 in CrChR2) und könnten im Rahmen der Signaltransduktion durch eine spezielle Kinase (mit AarF-Domänen) phosphoryliert werden (Wagner *et al.* 2007).

1.3.10 Photozyklus nach Laseranregung

Kanalrhodopsine zeigen eine unterschiedliche Photochemie in Abhängigkeit der jeweiligen Lichtanregung, daher wird nachfolgend zwischen laserinduzierter (engl. *single turnover*) und Dauerlichtanregung (engl. *continuous illumination*) differenziert.

Kanalrhodopsin-2 aus Chlamydomonas reinhardtii

Nach Absorption eines Photons durchläuft CrChR2 wie BR (*cf.* Abbildung 3) eine zyklische Kaskade von spektralen Intermediaten. Die Lebensdauer der einzelnen Zustände nimmt graduell zu und reicht von wenigen Picosekunden bis hin zu mehreren Sekunden. Ein kompletter Durchlauf des Photozyklus für CrChR2 dauert ca. 20 bis 50 s. Währenddessen finden einige Protontransferprozesse, die De- und die Reprotonierung der RSB und die Kanalöffnung und -schließung statt. Die zugrunde liegenden molekularen Ereignisse wurden intensiv mit diversen optischen z.B. UV-vis- und FTIR-Spektroskopie sowie elektrophysiologischen Methoden untersucht. Abbildung 6A, B fassen die charakterisierten Intermediate und wichtige Akteure zusammen.

Nach der Absorption eines Photons zerfällt der angeregte Zustand mit 400 fs in das primäre 13-*cis*-Photoprodukt, welches mit einer Zeitkonstante von 2.7 ps in das frühe rot-verschobene P₅₀₀ „abkühlt“ (Verhoefen *et al.* 2010). Die Isomerisierung induziert erste Proteinbewegungen (Amid I-Schwingungen) 0.5 ps nach Laseranregung, wobei die Überschussenergie effizient an die Proteinumgebung und gebundene Wassermoleküle abgegeben wird (Neumann-Verhoefen *et al.* 2013). Mit einer Zeitkonstante von 200 ps relaxiert der verdrillte 13-*cis*-Chromophor zum eigentlichen P¹₅₀₀ (Scholz *et al.* 2012), welches nachfolgend in einem thermischen Schritt ($t_{1/2} = 400$ ns) zum P²₅₀₀ konvertiert. Die Präsenz von zwei frühen P₅₀₀-Intermediaten (P500[#] & P500) wurde auch in Tieftemperatur-Raman-Spektren beobachtet (Bruun *et al.* 2015). Die Bildung von P₅₀₀ ist assoziiert mit großen Konformationsänderungen des Proteins (Ritter *et al.* 2008; Radu *et al.* 2009; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013).

Während dem anschließenden Übergang zu P₃₉₀ laufen zwei Prozesse ab: Zum einen wird die Kanalvoröffnung durch die Deprotonierung der Glutaminsäure E90 innerhalb des Zentralen Tors eingeleitet (*cf.* Kapitel 1.3.4) (Kuhne *et al.* 2015). Zum anderen transferiert die RSB ihr Proton auf den (die) Protonakzeptor(en) E123 oder/und D253 (*cf.* Kapitel 1.3.8), was mit einer signifikanten Verschiebung des Absorptionsmaximums des Proteins in den ultravioletten Spektralbereich korreliert. Spektroskopische Experimente sowie theoretische Überlegungen haben nahegelegt, dass das deprotonierte Intermediat P₃₉₀ eigentlich aus zwei

Subspezies, einem frühen P_{390}^1 und einem späten P_{390}^2 , besteht (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013; Lórenz-Fonfría & Heberle 2014; Spudich *et al.* 2014). Es wurde angenommen, dass in dem UV-vis-stillen Übergang dieser beiden Intermediate die ionenleitende Pore gebildet wird (*cf.* Kapitel 1.3.12).

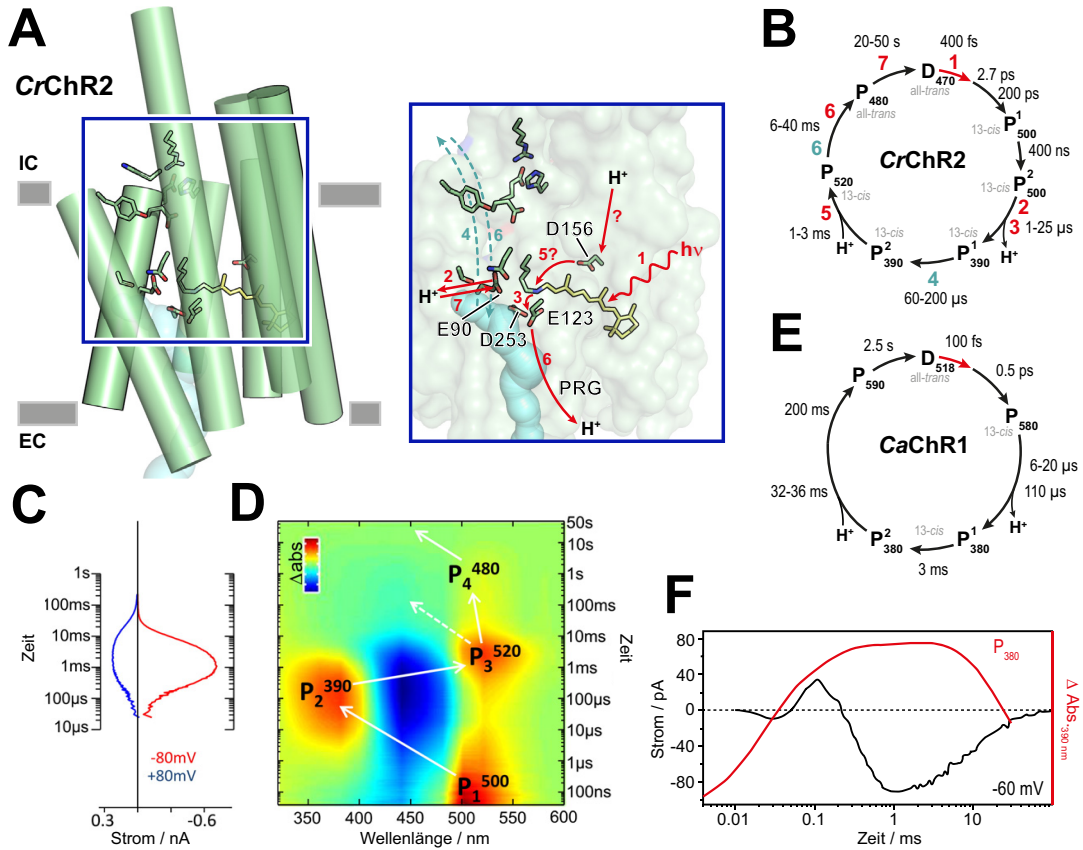


Abbildung 6: Photozyklen von CrChR2 und CaChR1 nach Laseranregung. **A)** Protonentransferschritte (*rot*) sowie Kanalöffnung und -schließung (*türkis*) innerhalb des Photozyklus von CrChR2 (Strukturmodell auf Basis von C1C2, PDB: 3ug9) sind schematisch dargestellt (*rechts*). Photonabsorption und Isomerisierung des Retinal-Moleküls (*all-trans* → *13-cis*) (1). Deprotonierung von E90 (2). H^+ -Übertragung von der RSBH⁺ zu(m) Protonakzeptor(en) D253 (& E123) (3). Öffnung des Ionenkanals (4). Reprotonierung der RSB, wobei der genaue Protondonor noch diskutiert wird. Lórenz-Fonfría *et al.* (2013) vermuteten D156 (5). Kanalschließung und Dissoziation eines H^+ vom Gegenionenkomplex zur extrazellulären Seite (evtl. mediiert über eine BR-homologe *proton release group* (PRG)) (6). Reprotonierung von E90 (7). Der exakte Protondonor bzw. -akzeptor von E90 ist nicht bekannt (Pfeile arbiträr orientiert) und auch der Zeitpunkt der Deprotonierung wird kontrovers diskutiert, ebenso wie der Zeitpunkt der Reorientierung. **B)** Beobachtete spektrale Intermediate, das zugrunde liegende Retinal-Isomer und Zeitkonstanten sind zusammengefasst. Photozyklus und Geschwindigkeitskonstanten basieren auf den folgenden Publikationen: Ritter *et al.* (2008); Verhoeven *et al.* (2010); Scholz *et al.* (2012); Lórenz-Fonfría *et al.* (2013); Kuhne *et al.* (2015) und Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* (2015). Zeitliche Korrelation des Kanalstroms innerhalb laserinduzierter Elektrophysiologie-Messungen an CrChR2 (**C**) mit spektralen Intermediate detektiert in Blitzlichtphotolyse-Messungen (**D**). C und D sind entnommen und modifiziert aus Lórenz-Fonfría & Heberle 2014 mit Erlaubnis von Elsevier (Amsterdam, Niederlande). **E)** Photozyklus von CaChR1. **F)** Zeitliche Korrelation des laserinduzierten Photostroms (*schwarz*) mit transienten Absorptionsänderung bei 390 nm (*rot*, P_{380} -Intermediate) von CaChR1. Daten und Zeitkonstanten sind entnommen aus: Sineshchikov *et al.* (2013); Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Heberle *et al.* (2014); Stensitzki *et al.* (2015) und Schnedermann *et al.* (2016).

Infolge der Progression des Photozyklus wird die RSB reprotoniert und es bildet sich ein zum Dunkelzustand rot-verschobener Zustand P_{520} . Als potentieller Protondonor wurde das

ca. 10 Å entfernte D156 vorgeschlagen (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013), welches allerdings in manchen ChRs wie z.B. Chrimson (C198, Protein-ID: AHH02126), ChR1 aus *C. bilatus-A* (C197, Protein-ID: AHH02128) (Klapoetke *et al.* 2014) und ChR2 aus *Pleodorina starrii* (S114, GenBank: AEY68813) (Zhang *et al.* 2011) nicht konserviert ist, weswegen auch eine Reprotonierung durch ein nahes Wassermolekül möglich wäre.

P₅₂₀ wandelt sich thermisch in das späte P₄₈₀ um, ein Intermediat welches ähnliche spektrale Eigenschaften wie der Dunkelizustand aufweist. Dieser Übergang wird mit der Schließung des Kanals, der Deprotonierung des Gegenionenkomplexes (Kuhne *et al.* 2015) und der Reisoomerisierung des Retinal-Cofaktors assoziiert (Radu *et al.* 2009; Berndt *et al.* 2009). Ob in Analogie zu BR das Proton des H⁺-Akzeptors über eine *proton release group* (PRG) zur extrazellulären Seite transportiert wird, beziehungsweise, ob es überhaupt zu einem parallelen lichtinduzierten vektoriellen Protontransport in ChR kommt, wird gegensätzlich diskutiert. Evidenzen für eine PRG wurden mittels transientser pH-Messungen mithilfe eines pH-Indikators erhärtet, jedoch wurde über die beteiligten Aminosäuren innerhalb des extrazellulären Halbkanaals nur spekuliert (Nack *et al.* 2012; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013). Weitere Diskrepanzen betreffen die Einordnung des P₄₈₀-Intermediats innerhalb des Photozyklus. Während die zuvor geäußerten Ausführungen den späten Zustand innerhalb des sequentiellen Modells verorten, wurde P₄₈₀ in einigen Studien als Seitenarmspezies (Bamann *et al.* 2008; Lórenz-Fonfría & Heberle 2014) bzw. als zweiter Dunkelizustand (C2) (*cf.* Kapitel 1.3.14) (Ernst *et al.* 2008; Stehfest & Hegemann 2010) beschrieben, welcher nur zu einem geringeren Anteil (25 %) bzw. nur unter Langzeitbelichtung populierte werden würde.

Im letzten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionssequenz wird der Dunkelizustand D₄₇₀ restauriert und simultan E90 reprotoniert (Ritter *et al.* 2008; Eisenhauer *et al.* 2012). Da die Rückkehr nach D₄₇₀ unter sauren Bedingungen dreimal langsamer als bei neutralem und alkalischem pH abläuft, wurde eine zusätzliche P₄₈₀-Subspezies (P_{480a}) postuliert, welche in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit dem späten P₄₈₀ (P_{480b}) steht (nicht gezeigt in Abbildung 6B) (Ritter *et al.* 2008).

Kanalrhodopsin-1 aus Chlamydomonas augustae

Das grün-absorbierende ChR1 aus *C. augustae* (Abbildung 6E) weist in Bezug auf Photozykluskomposition und Kinetiken deutliche Unterschiede zu ChR2 auf. Die Photoisomerisierung in CaChR1 (all-*trans* → 13-*cis*) erfolgt mit 100±50 fs (Stensitzki *et al.* 2015) bzw. 110±7 fs (Schnedermann *et al.* 2016) signifikant schneller als in ChR2 und stellt eine der schnellsten bisher beobachteten Isomerisierungsreaktionen innerhalb der Retinal-Proteinfamilie dar. Das gebildete primäre Photoprodukt P₅₈₀ (auch P₁ genannt) besitzt einen verdrillten 13-*cis*-Chromophor und relaxiert anschließend mit 500±100 fs und 5±1 ps (Stensitzki *et al.* 2015) bzw. ~580 fs (Schnedermann *et al.* 2016). Eine Quantenausbeute (Φ) von 60±6 % wurde für die zugrunde liegende Isomerisierung bestimmt (Stensitzki *et al.* 2016). Im weiteren Verlauf des Photozyklus konvertiert P₅₈₀ unter Dissoziation des Protons der RSB zu einer langlebigen, biphasisch abklingenden Spezies P₃₈₀ (P₃₈₀¹ & P₃₈₀²). P₃₈₀ ist über mehrere Dekaden thermisch

stabil und geht unter Aufnahme eines H^+ in das späte P_{590} über, welches mit einer Zeitkonstante von 2.5 s den Dunkelzustand D_{518} repopuliert (Sineshchekov *et al.* 2013).

1.3.11 Photozyklus unter Dauerlicht

Unter Langzeitbelichtung zeigen ChRs komplexere Stromkurven als nach kurzer Blitzanregung. Die zugrunde liegenden Phänomene sollen am Beispiel von *CrChR2* exemplarisch dargestellt werden (Abbildung 7). Je nach angelegter Spannung und Ionengradienten zeigt *CrChR2* entweder Einwärts- oder Auswärtsströme, wobei die Stromamplitude sowie Flussrichtung nicht linear mit den Spannungswerten korreliert, sondern eine Präferenz für einwärtsgerichtete Ströme aufweist (Einwärts-Rektifizierung) (Abbildung 7A, Einschub). Die Spannung bei der Einwärts- und Auswärtsströme im Gleichgewicht stehen, d.h. kein effektiver Photostrom zu beobachten ist, wird als Umkehrpotential (engl. *reversal potential*, E_{rev}) bezeichnet. Nach Lichtanregung bildet sich ein früher Kanalstrom (I_t) mit einer Zeitkonstante von ca. 200 μ s, welcher sein Maximum nach 1 - 2 ms erreicht (Braun & Hegemann 1999; Bamann *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009). Unter kontinuierlicher Belichtung reduziert sich die Stromamplitude biphasisch und approximiert ein stationäres Niveau (I_s), ein Vorgang welcher als Inaktivierung bzw. Desensibilisierung bezeichnet wird (Nagel *et al.* 2003; Tsunoda & Hegemann 2009). Nach Ausschalten des Anregungslichts klingt der Ionenstrom biexponentiell auf null ab (Hegemann *et al.* 2005; Nikolic *et al.* 2009). Bei kurzzeitig aufeinanderfolgender Mehrfachbelichtung ist die Amplitude des frühen Kanalstroms I_t reduziert (Lichtadaptation) und erreicht erst ihr ursprüngliches Niveau nach einer Dunkelphase von 10 - 15 s (Δt) zwischen den einzelnen Lichtpulsen (Dunkeladaptation) (Abbildung 7B).

Die elektrophysiologischen Befunden, vor allem die Inaktivierung, die biphasische Abklingkinetik sowie die langsame Rückkehr des Peakstroms, lassen sich nur mit einem Vier-Zustands-Modell aus zwei geschlossenen (C1 & C2) und zwei offenen (O1 & O2) Zuständen erklären (Abbildung 7D) (Hegemann *et al.* 2005; Nikolic *et al.* 2009). Nach dem hiesigen Modell bevölkert dunkeladaptiertes ChR ausschließlich C1 und wird durch einen Lichtstimulus in O1 überführt. Bei kontinuierlicher Belichtung bildet sich jedoch innerhalb von Millisekunden ein Gleichgewicht zwischen beiden offenen Zuständen, welche nach Belichtungsende in ihre korrespondierenden Dunkelzustände C1 und C2 mit $\tau_1 = 10$ ms und $\tau_2 = 40$ ms übergehen (biexponentielle Kinetik). Die Konversion von C2 nach C1 ist irreversibel und mit einer Zeitkonstante von 2 - 10 s der langsamste und somit geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dunkeladaptation, d.h. C1 repräsentiert den dunkeladaptierten und C2 den lichtadaptierten geschlossenen Zustand (Nikolic *et al.* 2009). Während für den Übergang $C1 \rightarrow O1$ eine hohe Quantenausbeute postuliert wurde, wird die Photoaktivierung von C2 ($C2 \rightarrow O2$) als wenig effektiv beschrieben. Trotz der Kurzlebigkeit von O1 zeigt es eine hohe Leitfähigkeit (~ 10 - 20fach größer als O2), wohingegen O2 zwar eine größere Lebenszeit aufweist, aber weniger Ionen transportiert. Bezogen auf die gezeigten Stromkurven von *CrChR2* in Abbildung 7 kann I_t (eigentlich I_0) nahezu ausschließlich durch die Leitfähigkeit von O1 und I_s durch das

Gleichgewicht beider leitenden Zustände (O1 & O2) beschrieben werden. Das Ausmaß der Inaktivierung ist demzufolge gut mit dem geringeren Anteil an dem besser leitenden O1 in I_s vereinbar. Zusammengefasst lassen sich die Adaptationsphänomene zum einen durch die Akkumulation von C2 auf Kosten von C1 (Lichtadaptation) und zum anderen durch die langsame Rückreaktion von C2 nach C1 (Dunkeladaptation) erklären.

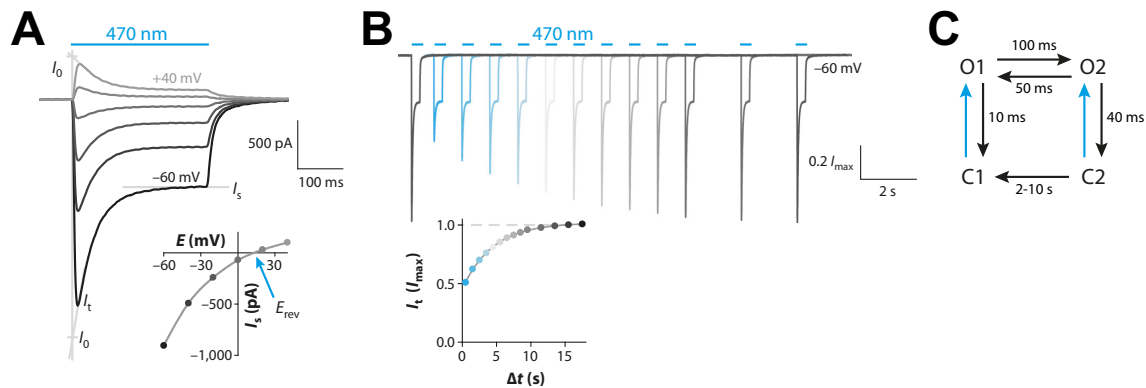


Abbildung 7: Photozyklus von CrChR2 unter Dauerlicht. **A)** Elektrophysiologische Messungen an CrChR2 exprimiert in HEK293-Zellen. Nach Lichtanregung (blauer Balken) bildet sich ein früher Peakstrom (I_t), der unter kontinuierlicher Belichtung in einen stationären Strom (I_s) übergeht (biexponentielle Inaktivierung bzw. Desensibilisierung). Nach Ausschalten des Lichts fällt der Strom biphasisch ab und nähert sich dem ursprünglichen Null-Niveau an. I_0 , initialer (extrapolierter) Strom. Strom-Spannungs-Diagramm (I_s/E) impliziert einwärtsgerichtete Kanalaktivität (Einschub). Das Umkehrpotential (E_{rev} , blauer Pfeil) beschreibt den Spannungswert bei dem kein Nettotransport über die Membran zu beobachten ist. Bei Über- bzw. Unterschreiten von E_{rev} ändert sich die Transportrichtung der Ladungsträger entsprechend. **B)** Licht- und Dunkeladaptation bei Mehrfachbelichtung (blaue Balken). Die Amplitude von I_t korreliert mit der Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtpulsen (Δt). I_s ist unabhängig von der intermediären Dunkelpause. **C)** Vier-Zustands-Modell mit zwei offenen (O1 & O2) und zwei geschlossenen (C1 & C2) Zuständen. Lichtinduzierte (blau) und thermische (schwarz) Reaktionen sind skizziert. Zeitkonstanten stammen aus Hegemann *et al.* (2005) und Nikolic *et al.* (2009). A - C modifiziert aus Schneider *et al.* (2015) mit Erlaubnis von Annual Reviews (Palo Alto, CA, USA).

Auf Basis eines kinetischen Modells wurden Aussagen über die Ionenselektivitäten der einzelnen offenen Zustände getroffen. Der initiale Strom I_0 (extrapolierter Strom zum Zeitpunkt Null, Abbildung 7A) wird zum größten Teil durch H^+ (33 % Na^+) getragen. Im Gegensatz dazu zeigt I_s eine Präferenz für Na^+ (48 %) (Schneider *et al.* 2013), d.h. das mit längerer Belichtung auch die Selektivität der Ionenpore für das monovalente Kation zunimmt.

Ein komplementäres Erklärungsmodell der Inaktivierung bezieht sich auf die Akkumulation später nichtleitender langlebiger Intermediate wie z.B. P_{480} in dem Hybrid aus V_{ChR1} und 2 (V1V2-25) (Ernst *et al.* 2008) oder dem P-Intermediat in P_{ChR2} (Szundi, Li *et al.* 2015; Szundi, Bogomolni *et al.* 2015) unter Dauerlicht. In V1V2-25 und CrChR2 wurden C1 und C2 den spektralen Zuständen D_{470} und P_{480} (Abbildung 6B) zugeordnet, da der Übergang von P_{480} nach D_{470} in einem ähnlichen Zeitbereich wie die Dunkeladaptation (Δt) des frühen Kanalstroms I_t abläuft (Ernst *et al.* 2008; Stehfest & Hegemann 2010). Allerdings setzte diese Zuordnung voraus, dass das späte Intermediat P_{480} photoaktiv sein muss, da ansonsten der Kanalstrom unter Dauerlicht graduell bis auf null abnehmen würde (Ritter *et al.* 2008). Lórenz-Fonfría *et al.* postulierten, im Gegensatz zu Kuhne *et al.*, dass E90 in CrChR2 erst im Übergang von P_{520} nach P_{480} deprotonieren würde. Die resultierende verstärkte Wechselwirkung des

ionischen E90 mit N258 im zentralen Tor im P₄₈₀-Zustand könnte das Schließen des Kanals begünstigen und so die partielle Inhibierung der Kanalströme unter kontinuierlicher Belichtung erklären (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013).

In manchen ChRs, besonders den H⁺-selektiveren Varianten wie z.B. Chrimson werden verhältnismäßig mehr Protonen als einwertige Kationen transportiert. Folglich kommt es in diesen ChRs unter kontinuierlicher (Langzeit-)Belichtung zu einer stärkeren intrazellulären Azidifizierung und der transmembrane Protonengradient nimmt stärker ab als in weniger H⁺-selektiveren ChRs (Vierock *et al.* 2017). Diese „apparente Inaktivierung“ äußert sich zwar ebenfalls durch eine Abnahme des Photostroms unter kontinuierlicher Belichtung, sollte mit der oben beschriebenen Inaktivierung, welche entweder durch Equilibrierung zweier leitender Zustände oder durch die Akkumulation von späten nichtleitenden Intermediaten erklärt wird, nicht verwechselt werden.

Das Phänomen der Inaktivierung wird als physiologischer Schutzmechanismus der Algen vor vollständiger Depolarisierung der Zellmembran während erhöhter Lichtexposition gedeutet (Braun & Hegemann 1999; Ehlenbeck *et al.* 2002).

1.3.12 Leitender Zustand

Die Zuordnung des leitenden Zustands zu einem spektralen Intermediat ist zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht vollends geklärt. Während frühe Arbeiten an CrChR2 den reprotonierten P₅₂₀ als alleinigen leitenden Zustand im Photozyklus proklamierten (Bamann *et al.* 2008), wird in aktuellen Modellen eine Entkopplung von Kanalaktivität und einem konkreten spektralen Intermediat angenommen. Nach Laseranregung öffnet sich der Kanal im Übergang zwischen den beiden P₃₉₀-Intermediaten mit einer Zeitkonstante von ~200 µs, erreicht die maximale Leitfähigkeit nach 1 - 2 ms und schließt zeitgleich mit dem Abklingen des P₅₂₀-Zustands (Abbildung 6C, D) (Lórenz-Fonfría & Heberle 2014). Eine analoge Betrachtung für CaChR1 suggeriert das deprotonierte P₃₈₀-Intermediat als alleinigen offenen Zustand, da es im gesamten Zeitbereich der Kanalöffnung und -schließung die einzige (sichtbare) spektrale Spezies darstellt (Abbildung 6F). Jedoch ist eine zeitliche Korrelation zwischen elektrophysiologischen und spektroskopischen Messungen nicht trivial, da neben der unterschiedlichen Proteinumgebung (komplexe, aber nicht native Membranen *vs.* Detergens bzw. simple Lipide), in elektrophysiologischen Experimenten externe Spannungen an die Membran angelegt werden, um lichtaktivierbare Transportphänomene zu beobachten. Dabei hat die angelegte Spannung auch einen Einfluss auf die Kinetik des leitenden Zustands und verlangsamt die Kanalöffnung und -schließung bei positiveren Spannungswerten (Abbildung 6C) (Ritter *et al.* 2008; Bamann *et al.* 2008). Da Standard-UV-vis- und FTIR-Studien an ChRs spannungsfrei durchgeführt werden und die meisten ChRs bei 0 mV vernachlässigbar kleine Ströme aufweisen, ist die Zuordnung des leitenden Intermediates auf Basis eines kinetischen Vergleichs mit Vorsicht zu genießen.

Eine kinetisch unabhängige Zuordnung des leitenden Zustands ermöglichen die SFO-Mutationen, welche die Lebenszeit des offenen Zustands drastisch verlängern (*cf.* Tabelle

2). Obwohl alle rekombinanten SFOs nach Lichtaktivierung in UV-vis-Studien eine Akkumulation von P₃₉₀ und P₅₂₀ zeigen, reichern C128A, C128S, D156A und C128S-D156A bevorzugt P₃₉₀ und C128T mehr P₅₂₀ an (Stehfest *et al.* 2010; Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011).

Unter kontinuierlicher Belichtung bieten Inaktivierungsexperimente mit einem zweiten Lichtpuls weiteren Aufschluss über die ionenleitenden Intermediate. Nach Einstellung eines stationären Stroms konnte in *CrChR2*-Wildtyp (Bamann *et al.* 2008) sowie in den langsamen Mutanten C128A/T/S (Berndt *et al.* 2009; Stehfest *et al.* 2010), D156A (Bamann *et al.* 2010) und in der Doppel-Mutante C128S-D156A (Yizhar *et al.* 2011) mit grünem bis orangem Licht der Kanalschluss beschleunigt werden. Ein ähnliches Ausmaß an Inhibierung war durch das Einstrahlen von UV-Licht zu verzeichnen (Bamann *et al.* 2010; Stehfest *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011). Dabei werden die Intermediate P₃₉₀ (UV) und P₅₂₀ (grün) durch den zusätzlichen Lichtpuls in den Dunkelzustand überführt. Obwohl sowohl die UV-vis-Spektren der SFO-Mutanten als auch die Inaktivierungsexperimente beiden Intermediaten eine Anteilnahme am Ionentransport beipflichten, lässt sich ein schnelles Gleichgewicht zwischen einem nichtleitenden (P₃₉₀) und einem leitenden (P₅₂₀) Intermediat nicht völlig ausschließen (Bamann *et al.* 2008; Ritter *et al.* 2008). Nach dem Prinzip des kleinsten Zwangs (Le Chatelier) würde die lichtinduzierte Konversion von P₃₉₀ das Gleichgewicht auf die Eduktseite verschieben und so den von P₅₂₀ getragenen Kanalstrom reduzieren.

1.3.13 Retinal-Isomere

Die erste Kristallstruktur der dunkeladaptierten ChR-Chimäre C1C2 wurde mit einem gebundenen all-*trans*-, d.h. 13-*trans*, 15-*anti*- (Abbildung 8A), Retinal gelöst (Kato *et al.* 2012). Jedoch ist von anderen mikrobiellen Rhodopsinen wie BR oder *Anabaena sensory rhodopsin* (ASR) bekannt, dass sie neben 13-*trans*, 15-*anti*- auch 13-*cis*, 15-*syn*-Retinal im Dunkelzustand (Abbildung 8B) binden (Pettei *et al.* 1975; Harbison *et al.* 1984; Vogeley 2004). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Auflösung (2.4 Å) der C1C2-Kristallstruktur kann die Koexistenz eines 13-*cis*, 15-*syn*-Chromophors im dunkeladaptierten Zustand nicht völlig ausgeschlossen werden (Kato *et al.* 2012). Es bedarf daher einer Auflösung ≤ 2.0 Å, wie in der ASR-Röntgenstruktur (Vogeley 2004), um dies zu klären. Strukturunabhängige Belege liefern Retinal-Extraktionsexperimente mit nachfolgender chromatographischer Trennung sowie spektroskopische Methoden wie Resonanz-Raman- oder Kernspinresonanz- (NMR) Spektroskopie.

Basierend auf Resonanz-Raman- und Retinal-Extraktionsexperimenten wurde ein Verhältnis von 70:30 (all-*trans*:13-*cis*) im dunkeladaptierten *CrChR2* identifiziert, welches sich allerdings nur marginal nach Belichtung änderte (65:30:5 all-*trans*:13-*cis*:9-*cis*) (Nack *et al.* 2009). Eine nahezu deckungsgleiche Verteilung wurde für die langsame SFO-Mutante C128T, das grün-absorbierende *CaChR1* sowie für *P_sChR2* beobachtet (Tabelle 3) (Stehfest *et al.* 2010; Govorunova *et al.* 2013; Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu anderen mikrobiellen Rhodopsinen wie BR und ASR, welche ein hohes

28

Maß an Lichtadaptation ^D und damit eine signifikante Veränderung der Isomerenverhältnisse zwischen Dunkel- und belichtetem Zustand demonstrieren (Pettei *et al.* 1975; Harbison *et al.* 1984; Vogeley 2004). Es soll an dieser Stelle gesagt sein, dass Extraktionsexperimente ohne vorherige Hydroxylamin-Behandlung (Bildung von Retinal-Oximen) nicht vermögen, über die Konfiguration der C₁₅=N-Bindung Aussagen zu treffen, da diese infolge der Denaturierung zum freien Aldehyd hydrolysiert wird. Als mögliche Erklärung für die geringen Änderungen der Isomerenverteilung in ChRs wurde eine lichtinduzierte Konversion der beiden Grundzustandsisomere, 13-*trans*, 15-*anti* \leftrightarrow 13-*cis*, 15-*syn*, in Erwägung gezogen, welche die Daten allerdings nur quantitativ erklären könnte, wenn der Übergang ineinander zu gleichen Anteilen und mit ähnlicher Geschwindigkeit ablaufen würde.

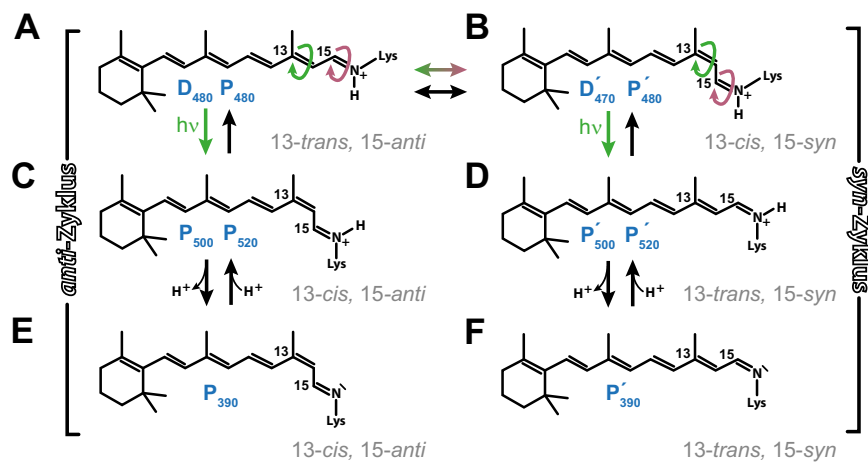


Abbildung 8: Retinal-Isomere in CrChR2. A und B entsprechen den beiden Dunkelzuständen D₄₈₀ und D'₄₇₀. A, C und E sind Isomere des *anti*-Zyklus (C₁₅=N immer in *anti*-Konfiguration) und B, D und F gehören zum *syn*-Zyklus (C₁₅=N immer in *syn*-Konfiguration). Spektrale Intermediate (*blau*) des CrChR2-Photozyklus (*cf.* Abbildung 6B). Zustände des *syn*-Zyklus sind apostrophiert ('). Thermische (*schwarze Pfeile*) und lichtinduzierte (*farbige Pfeile*) Reaktionen sind eingezeichnet. E und F tragen eine deprotonierte RSB. Zuordnung basiert auf folgenden Publikationen: Ritter *et al.* (2008); Berndt *et al.* (2009); Nack *et al.* (2009); Ritter *et al.* (2013) und Bruun *et al.* (2015).

Im Gegensatz zu den vorher genannten Studien (durchgeführt mit Detergensproben) beobachtete Ritter *et al.* eine signifikante Zunahme von 13-*cis*-Spezies unter Verwendung von lipidrekonstituiertem CrChR2-C128T. Während die Verhältnisse im Dunkelzustand (78:22 *all-trans*:13-*cis*) in guter Übereinstimmung zu den Detergensproben waren, war eine lichtinduzierte Isomereninversion bei den Vesikelpuben zu verzeichnen. Dabei war das Ausmaß der Anreicherung von 13-*cis*-Spezies abhängig von der eingestrahnten Lichtfarbe (blau *vs.* grün).

^D Lichtadaptation bezieht sich in diesem Kontext auf die Veränderung der Isomerenverhältnisse nach Belichtung. Nicht zu verwechseln mit dem electrophysiologischen Phänomen, welches für ChRs eine Reduktion des frühen Kanalstroms (*I_p*) bei kurzzeitiger Mehrfachbelichtung ($\Delta t < 10 - 15$ s) beschreibt (*cf.* Kapitel 1.3.11).

Nach blauer Belichtung ($\lambda_{\text{Exz}} = 470 \text{ nm}$, 5 min) und anschließender dreiminütiger Dunkelphase stellte sich ein Verhältnis von 24:59:11:6 (all-*trans*:13-*cis*:9-*cis*:11-*cis*) und bei analoger Behandlung mit Grünlicht ($\lambda_{\text{Exz}} = 520 \text{ nm}$, 5 min) von 24:64:8:4 ein (Ritter *et al.* 2013). Ähnliche Tendenzen wurden auch für die schnelle E123T-Mutante beobachtet (Tabelle 3). Basierend auf diesen Daten wurden zwei verschiedene lichtadaptierte Zustände (dunkeladaptierter Zustand nach Blaubelichtung, DAB & dunkeladaptierter Zustand nach Grünbelichtung, DAG) mit einer unterschiedlichen Retinal-Isomerenverteilung angenommen. Jedoch waren diese Verhältnisse nicht statisch und es bildete sich im Dunkeln innerhalb einer Stunde ein erhöhter Anteil von all-*trans*-Spezies zurück (41 % nach $\lambda_{\text{Exz}} = 470 \text{ nm}$; 33 % nach $\lambda_{\text{Exz}} = 520 \text{ nm}$).

Tabelle 3: Retinal-Isomerenverhältnis in Kanalrhodopsinen. Differenz zu 100 % im belichteten Zustand fallen auf 9-*cis*- bzw. 11-*cis*-Retinal ab (nicht aufgelistet). Extraktion der Isomere 3 min nach Belichtung (1). Extraktion der Isomere 10 min nach Belichtung (2).

ChR	Dunkelzustand / %		belichteter Zustand / %		Belichtung	Methode	Referenz
	all- <i>trans</i>	13- <i>cis</i>	all- <i>trans</i>	13- <i>cis</i>			
C1C2	100					Liposomen, NMR	Bruun et al., 2015
CrChR2	100					Liposomen, NMR	Becker-Baldus et al., 2015
CrChR2	100		83	17	$\lambda > 480 \text{ nm}$, 10 min	Liposomen, HPLC	Kirsch, 2007
CrChR2	70	30	65	30	$\lambda > 425 \text{ nm}$, 10 min	Detergensproben, HPLC, Raman	Nack et al., 2009
CrChR2-E123T	78	22	12	70	470 / 520 nm, 5 min	Lipidvesikel, HPLC ²	Ritter et al., 2013
CrChR2-C128T	70	30	65	30	450 nm, 5 min	Detergensproben, HPLC	Stehfest et al., 2010
CrChR2-C128T	78	22	24	59	470 nm, 5 min	Lipidvesikel, HPLC ¹	Ritter et al., 2013
			24	64	520 nm, 5 min		
CrChR2-H134R			75	25		Raman	Bruun et al., 2015
CaChR1	71	27	65	33	500 nm, 10 min	Detergensproben, HPLC	Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfria, Bamann et al., 2014
	70	30				Raman	
CaChR1	~100					Lipidvesikel, Raman	Ogren et al., 2014
PsChR2	75	25	keine signifikanten Änderungen		432 nm, 2 min	Detergensproben, HPLC	Govorunova et al., 2013
V1V2-25	60	40	60	40			Stehfest & Hegemann, 2010
ReaChR			78	22	530 nm, 10 min	Detergensproben, HPLC ²	Teil dieser Arbeit

Für PsChR2 wurde eine Dunkeladaptationsrate von $\tau = 26 \text{ min}$ konstatiert (Govorunova *et al.* 2013). Die Resultate von Ritter *et al.* suggerieren ein erhebliches Ausmaß an Lichtadaptation in CrChR2, werfen aber die Frage auf, ob eine komplexere lipidische Proteinumgebung die nativen Begebenheiten besser stabilisieren vermag oder ggf. sogar verlangsamt. Langzeit-FTIR-Messungen derselben Studie demonstrierten, dass sich der initiale Dunkelzustand (IDA) des Proteins (keinerlei Lichtexposition, Aufreinigung im Dunkeln) weder thermisch innerhalb einer Stunde noch mit Belichtung reproduzieren ließ, d.h. die zugrunde liegenden Prozesse laufen nur in vollständiger Dunkelheit mit sehr langsamen Kinetiken (einige Minuten bis Stunden) ab. Bereits geringe Lichtdosen sind ausreichend um den IDA in eine Mischpopulation aus 13-*trans*,

15-*anti*- und 13-*cis*, 15-*syn*-Retinal zu überführen (Bruun *et al.* 2015), was den Verdacht erhärtet, dass alle lichtbasierten Methoden das Isomerenverhältnis unwillkürlich durch das verwendete Messlicht beeinflussen könnten. Diese Hypothese wurde durch NMR-Messungen an langzeitdunkeladaptierten (> 7 Tage) Proben bestätigt, welche sowohl für C1C2 als auch für CrChR2 einen homogenen all-*trans*-Zustand (100 %) bilanzierten (Becker-Baldus *et al.* 2015; Bruun *et al.* 2015).

Eine Grundzustandsheterogenität, d.h. mehrere koexistierende Isomere, sollte sich auch im Rahmen von ultraschnellen UV-vis-Experimenten in kinetischen Unterschieden der Isomerisierung sowie der Bildung von ungleichen primären Photoprodukten in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{Exz.}}$) äußern. Entsprechende Messungen an CrChR2 ($\lambda_{\text{max}} = 470$ nm) zeigten keine Unterschiede zwischen $\lambda_{\text{Exz.}} = 420$ nm und $\lambda_{\text{Exz.}} = 482$ nm (Verhoeven *et al.* 2010). Des Weiteren änderte sich das Amplitudenverhältnis der beiden langlebigen Spezies P₃₉₀ und P₅₂₀ in den SFO-Mutanten in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtfarbe ($\lambda_{\text{Exz.}} = 439, 456 \text{ \& } 477$ nm) nicht (Bamann *et al.* 2010). Auch die kinetische Evolution und das Abklingen von Kanalströmen nach Laseranregung (10 ns Puls) in CrChR1 ist unabhängig von der Exzitationswellenlänge ($\lambda_{\text{Exz.}} = 421 - 575$ nm), lediglich die Amplituden korrelierten mit dem Unterschied zwischen $\lambda_{\text{Exz.}}$ und λ_{max} (Berthold *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009). Die vorherigen Studien resümierten einen homogenen Dunkelzustand für CrChR2. Während für den all-*trans*-Dunkelzustand in CrChR2 ein Absorptionsmaximum von 470 bzw. 480 nm angenommen wird, ist das entsprechende 13-*cis*, 15-*syn*-Pendant nur 10 nm blau-verschoben ($\lambda_{\text{max}} = 460$ nm bzw. 470 nm) (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015; Bruun *et al.* 2015).

Im Gegensatz zu dem blau-absorbierenden CrChR2, zeigt CaChR1 eine ausgeprägte Grundzustandsheterogenität. Die 13-*cis*, 15-*syn*-basierte Subpopulation ($\lambda_{\text{max}} = 480$ nm, D₄₈₀) ist gegenüber der 13-*trans*, 15-*anti*-Spezies ($\lambda_{\text{max}} = 540$ nm, D₅₄₀) um 60 nm in den kurzwelligeren Spektralbereich verschoben, was eine wellenlängenabhängige Diskriminierung der einzelnen Dunkelzustände ermöglichte (Stensitzki *et al.* 2015). Bei Illumination mit $\lambda_{\text{Exz.}} = 550$ nm wurde primär D₅₄₀ und mit $\lambda_{\text{Exz.}} = 500$ nm eine Mischung aus D₅₄₀ und D₄₈₀ angeregt. Nach Anpassung und Subtraktion der D₅₄₀ basierten Photochemie in dem gemischten Datensatz, konnten die Autoren die frühen lichtgetriebenen Ereignisse ausgehend von D₄₈₀ extrahieren. Basierend auf der Identifikation eines bis dato unbekannten Q-Photoprodukts und weiterer kinetischer Prozesse wurde das folgende Modell postuliert: Innerhalb von 100 ps ist der Großteil der 13-*cis*-Form nach Doppelisomerisierung (*cis** \rightarrow *trans**; *trans** \rightarrow *cis*) in die Ursprungskonformation (Q-Photoprodukt) relaxiert und nur ein kleiner Anteil bildet eine all-*trans*-Form. Ob im weiteren Zeitverlauf ein produktiver Photozyklus mitsamt Kationentransport induziert werden würde, hielten Stensitzki *et al.* für unwahrscheinlich. Ähnlich äußerten sich Lórenz-Fonfría *et al.* über CrChR2. Obwohl sie eine Photoaktivität beider Hauptisomere feststellten, ergaben ihre FTIR-Untersuchungen für die 13-*cis*, 15-*syn*-Spezies einen Photozyklus-Durchlauf von ca. 1 ms, zu schnell um für die Kanalfunktion relevant zu sein (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Die Autoren postulierten, dass die lichtinduzierte C₁₃=C₁₄-Isomerisierung im 13-*cis*, 15-*syn*-Isomer die RSB in eine unvorteilhafte Orientierung translozieren würde bzw. den pK_s-Wert der RSB

nicht ausreichend reduzieren könnte, um eine quantitative Deprotonierung zu katalysieren. Da die Dissoziation des Protons der Schiffchen Base eine funktionelle Determinante für die Kanalöffnung darstellt, könnte das Ausbleiben des Ionentransports erklärt werden (Lórenz-Fonfría & Heberle 2014).

1.3.14 Kombinierte Photozyklus-Modelle

Um die Erkenntnisse aus elektrophysiologischen, spektroskopischen und Retinal-Extraktionsexperimenten zu vereinen, wurden kombinierte Photozyklus-Modelle postuliert. Die Lichtadaptation der Retinal-Isomerenverteilung sowie die Rückkehrkinetik des frühen Kanalstroms wurde durch die Existenz zweier Dunkelzustände berücksichtigt. Dabei wurde C1 (D_{480}) 13-*trans*, 15-*anti*- und C2 (D_{470}) 13-*cis*, 15-*syn*-Retinal zugeordnet (Ritter *et al.* 2013; Bruun *et al.* 2015). Es wurde bedacht, dass D_{470} aufgrund des gebeugten π -Elektronen-Systems in der 13-*cis*-Konfiguration im Gegensatz zu all-*trans* in den blauen Spektralbereich verschoben sein müsste (Aton *et al.* 1977). Im IDA soll D_{480} mit 13-*trans*, 15-*anti*-Chromophor die alleinige Spezies sein, welche allerdings unter Belichtung in ein Gleichgewicht zwischen D_{480} und D_{470} (apparenter Dunkelzustand, DA_{app}) equilibriert. Der Beitrag der Anregung von D_{470} zum Kationentransport bleibt jedoch kontrovers. Um die Inaktivierung des Kanalstroms unter kontinuierlicher Belichtung zu erklären, bedarf es entweder der Existenz zweier offener Zustände (*cf.* Kapitel 1.3.11) oder der langsamen Rückkehr in den Dunkelzustand eines langlebigen nichtleitenden Photointermediats (*cf.* Kapitel 1.3.10).

Auf dieser Basis haben sich verschiedene Zwei-Zyklus-Modelle für ChRs mit entweder zwei leitenden Intermediaten im 13-*trans*, 15-*anti*-Zyklus (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015) oder jeweils einem offenen Zustand pro Zyklus (Stehfest & Hegemann 2010; Ritter *et al.* 2013; Bruun *et al.* 2015; Szundi, Bogomolni *et al.* 2015) etabliert. Da die Konfiguration der $C_{15}=N$ -Doppelbindung innerhalb einer Reaktionssequenz konserviert ist, wird zur Erleichterung im folgenden Teil der Arbeit die 13-*trans*, 15-*anti*-basierte Kaskade als *anti*-Zyklus und das 13-*cis*, 15-*syn*-Pendant als *syn*-Zyklus referenziert (*cf.* Abbildung 8). Weitere Unterschiede innerhalb der postulierten Modelle sind in der Komposition der jeweiligen Zyklen festzustellen. Zum einen wurden symmetrische, d.h. die gleichen Intermediate in *syn*- und *anti*-Zyklus (Stehfest & Hegemann 2010; Ritter *et al.* 2013; Bruun *et al.* 2015), und zum anderen unsymmetrische Modelle vorgeschlagen (Becker-Baldus *et al.* 2015; Szundi, Li *et al.* 2015; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Im Falle des schnellen C γ ChR2-E123T konnten die Intermediate des *syn*-Zyklus nicht exakt definiert werden (I_1 & I_2) (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Eine kinetische Analyse der transienten UV-vis-Daten des UV-absorbierenden P γ ChR2 lieferte zwei parallel ablaufende Photozyklen mit unterschiedlichen Durchlaufzeiten und spektraler Zusammensetzung. Dabei unterliefen 70 % der angeregten Proteine eine schnelle Reaktionssequenz aus K-, L-, M- und O-Intermediat und 30 % folgten einem langsameren Zyklus mit K-, M-, O- und P-Spezies (Szundi, Li *et al.* 2015). Die beiden leitenden O-Zustände weisen unterschiedliche Bildungs- und Zerfallskinetiken sowie verschiedene Leitfähigkeiten auf (Szundi, Bogomolni *et al.* 2015). Obwohl die Autoren keine Zuordnung der einzelnen Zyklen zu konkreten Retinal-Isomeren

anstellten, kann eine Übereinstimmung mit bereits diskutierten Extraktionsexperimenten nicht gelegnet werden (Tabelle 3).

1.3.15 pH-Effekte

Einige Kanalrhodopsine weisen ein hohes Maß an pH-Abhängigkeit auf, da sie viele saure und alkalische Aminosäuren tragen, welche in Abhängigkeit der vorliegenden H^+ -Konzentration protoniert bzw. deprotoniert werden. Diese Protonierungsreaktionen führen zu detektierbaren Verschiebungen der Proteinabsorption und der Aktionsspektren. Allerdings fallen die protochromen Verschiebungen in den einzelnen ChRs unterschiedlich stark aus. Während ChRs wie *CrChR2*, *P3ChR2*, *V1ChR2*, ChR aus *Mesostigma viride* (*MvChR*) und ChR1 aus *C. yellowstonensis* (*CyChR1*) im Dunkelzustand eine vernachlässigbare bis geringe Sensitivität ($\Delta\lambda_{\max} \leq 12$ nm) gegenüber pH-Wert-Änderungen (pH 4.5 - 9) demonstrieren, zeigen *CrChR1*, *V1ChR1* und *CaChR1* ausgeprägte Farbverschiebungen (Tabelle 4). Rekombinantes *CrChR1* zeigt unter alkalischen Bedingungen (pH 8) ein feinstrukturiertes Absorptionsspektrum mit zwei Maxima bei 450 und 470 nm (zentrales $\lambda_{\max} = 463$ nm, D_{463}). Bei Azidifizierung des Mediums (pH 4.5) verschiebt sich die maximale Amplitude nach 505 nm (D_{505}) und das Spektrum zeigt weniger Feinstrukturierung. Auf Basis der UV-vis-Messungen wurde ein pH-abhängiges Gleichgewicht der beiden Isoformen D_{463} und D_{505} mit einem pK_s -Wert von ~ 6.5 konstatiert (Berthold *et al.* 2008). In Analogie zu *CrChR1* besitzt *V1ChR1* auch zwei im Gleichgewicht ($pK_s \sim 7$) stehende pH-Isoformen (D_{540} , pH 4.5 & D_{500} , pH 9), wobei D_{540} eine ~ 25 % höhere Extinktion und eine geringere Halbwertsbreite als D_{500} aufweist. Im UV-vis Spektrum zeigt D_{500} eine zusätzliche Schulter bei ca. 480 nm (Kianianmomeni *et al.* 2009; Stehfest & Hegemann 2010).

Des Weiteren beeinflusst der pH-Wert die (De-)/Reprotonierung der RSB innerhalb des Photozyklus. Unter hoher Protonenstärke wurde in V1V2-25 sowie *CaChR1* kein bzw. weniger deprotoniertes P_{390} gebildet bzw. angereichert (Ernst *et al.* 2008; Li *et al.* 2014). Im Umkehrschluss wurde bei pH 10 eine höhere Anreicherung der deprotonierten RSB-Spezies in C1C2 wie bei pH 8 detektiert (Hontani, Marazzi *et al.* 2017). In *CrChR2*-C128T wurde mit abnehmendem pH das reprotonierte P_{520} auf Kosten von P_{390} gebildet (Bamann *et al.* 2010).

1.3.16 Photoaktivierung

Im Rahmen der Photoaktivierung wird unter Wasser-Reorientierung und Einstrom eine ionenleitende Pore gebildet. Während in den Kristallstrukturen des Dunkelzustands von C1C2 wenige (geordnete) Wassermoleküle (C1C2: 43; C1C2-GA: 19) aufgelöst sind (Abbildung 9) (Kato *et al.* 2012; Kato, Kamiya *et al.* 2015), zeigen Wassermodellierungen an *CrChR2* größere hydratisierte Bereiche im geschlossenen Zustand. Die Verteilung ist dabei diskontinuierlich und durch die beiden räumlichen Konstruktionen innerhalb der Pore (Zentrales und Inneres Tor) unterbrochen (Watanabe *et al.* 2013; Kuhne *et al.* 2015; Takemoto *et al.* 2015).

Tabelle 4: Protochrome Farbverschiebungen in Kanalrhodopsinen. C₃ChR1, ChR1 aus *Chlamydomonas yellowstonensis*; ChR1/2_{2/5}, Chimäre aus H1-2 von C₃ChR1 und H3-7 aus C₃ChR2; ChR1/2_{5/2}, Chimäre aus H1-5 von C₃ChR1 und H6-7 aus C₃ChR2; V1V2-223, Chimäre aus H1-2 & H5-7 aus V₁ChR1 und H3-4 aus V₁ChR2; V1V2-133, Chimäre aus H1 & H5-7 aus V₁ChR1 und H2-4 aus V₁ChR2; V1V2-421, Chimäre aus H1-4 & H7 aus V₁ChR1 und H5-6 aus V₁ChR2. Maximum des Aktionsspektrums aus elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus*-Oozyten (1) bzw. an HEK293-Zellen (2). UV-vis-Absorptionsmaximum von isoliertem Protein (3). Wenn zwei Maxima genannt, wurde zentrales Maximum zur Berechnung berücksichtigt (4). nahezu identisch unter sauren und alkalischen Bedingungen (5), rote Flanke bei pH 5.4 (6), Auswertung der pH-Titrationen über Absorptionsmaxima (7) bzw. maximale Absorptionsänderungen (8).

ChR	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$		$\Delta\lambda_{\text{max}} / \text{nm}^4$	pK_s	Referenz
	sauer	alkalisch			
C ₃ ChR1	505 (pH 4.5) ³ 495 (pH 5.5 - 6.5) ¹	450 / 470 (pH 8) ³ 470 (pH 9) ¹	45 25	~6.5 ³ ~7.5 ¹	Berthold et al., 2008
C ₃ ChR2	450 / 470 (pH 4.5 - 8) ³ 475 (pH 4 - 7.5) ¹		0 0		Ritter et al., 2008; Stehfest & Hegemann, 2010 Tsunoda et al., 2009
C ₃ ChR2-H134R	448 (pH 5.2) ³	445 (pH 9.2) ³	3	7.96 / 9.88 ⁷ 4.15 / 7.93 / 9.88 ⁸	Teil dieser Arbeit
V ₁ ChR1	540 (pH 4.5) ³ 535 (pH 7.2) ²	500 (pH 9) ³ 515 (pH 9) ²	40 20	7.0 ³	Kianianmomeni et al., 2009 Prigge, 2012
V ₁ ChR2	445 / 475 (pH 6) ³ 465 (pH 7) ¹		0 ⁵		Kianianmomeni et al., 2009 Prigge et al., 2012
CaChR1	525 (pH 2) ³ 520 (pH 5.4-7.4) ²	480 (pH 10) ³ 510 (pH 9) ²	45 10	2.7 / 5.5 / 9 ³	Li et al., 2014 Hou et al., 2012
PsChR2	445 (pH 4.3) ³ 445 (pH 5.4) ²	433 (pH 9) ³ 445 (pH 7.4-9) ²	12 0 ⁶	3.8 / 6.6 / 10.5 ³	Govorunova et al., 2013
MvChR	528 (pH 5.3-9) ²		0		Govorunova et al., 2011
CyChR1	520 (pH 5.4-7.4) ²	510 (pH 9) ²	10		Hou et al., 2012
Chrimson	585 (pH 7.2) ² 585 (pH 6) ³	550 (pH 9) ² 537 (pH 9.5) ³	35 48	7.4 bzw. 8.1 ³	Vierock et al., 2017 Urmann et al., 2017
C1C2	480 (pH 4) ³ 479 (pH 4.9) ³	450 / 470 (pH 10) ³ 469 (pH 9.1) ³	20 10	5.37 / 8.07 ⁷ 5.05 / 7.73 / 10.67 ⁸	Kato et al., 2012 Teil dieser Arbeit
ChR1/2 _{2/5}	485 (pH 4) ¹	470 (pH 7.5) ¹	15		Tsunoda et al., 2009
ChR1/2 _{5/2}	505 (pH 4) ¹	475 (pH 7.5) ¹	30		Tsunoda et al., 2009
C1V1	539±4 (pH 7.2) ²	514±3 (pH 9) ²	25		Prigge, 2012
V1V2-25	480 (pH 4.5) ³ 484 (pH 4) ¹	450 / 470 (pH 8) ³ 470 (pH 7.5) ¹	20 14		Ernst et al., 2008
V1V2-223	550 (pH 5) ¹	485 (pH 9) ¹	65		Prigge et al., 2012
V1V2-133	540 (pH 5) ¹	480 (pH 9) ¹	60		Prigge et al., 2012
V1V2-421	545 (pH 5) ¹	485 (pH 9) ¹	60		Prigge et al., 2012
ReaChR	535 (pH 5) ³	503 (pH 9) ³	32	2.82 / 6.76 / 8.01 ⁷ 7.76 / 8.71 ⁸	Teil dieser Arbeit

Da zum jetzigen Zeitpunkt keine Röntgenstruktur des leitenden Zustands eines ChR existiert, stellt sich die Frage, wie der Ionenkanal gebildet wird und welche Reste bzw. Helices daran beteiligt sind. Erste Schlüsse lassen sich von dem B-Faktor der C1C2-Kristallstruktur ableiten, welcher in den intrazellulären Enden von H1 und H2 höhere Werte annimmt (Abbildung 10A) (Kato *et al.* 2012). Ein vergrößerter B-Faktor sowie ein in der Kristallstruktur

nicht aufgelöster ICL1 implizieren eine flexiblere Proteinregion, welche sich infolge der Lichtaktivierung bewegen könnte.

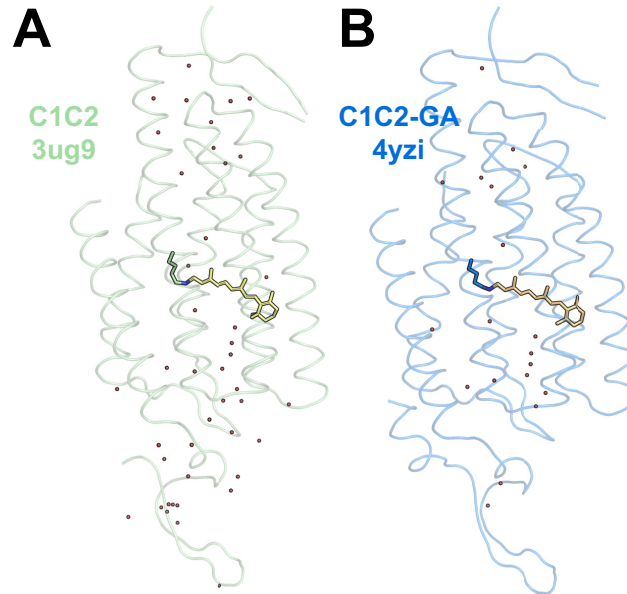


Abbildung 9: Wasserverteilung in C1C2 und C1C2-GA im geschlossenen Dunkelzustand. Wassermoleküle (rote Punkte) in den Röntgenstrukturen von unbelichtetem C1C2 (A, PDB: 3ug9) und C1C2-GA (B, PDB: 4yzi).

In 2013 berichteten zwei Elektronenspinresonanz-Studien (ESR) an *CrChR2* und der langsamen C128T-Mutante von einer lichtinduzierten Auswärtsbewegung von H2 und kleineren strukturellen Änderungen der H7 (Sattig *et al.* 2013; Krause *et al.* 2013). Ein Jahr später wurde mittels kryostatischer Elektronenmikroskopie an letztgenannter Mutante gezeigt, dass nach Lichtanregung eine partielle Entfaltung des cytoplasmatischen Terminus von H2 und geringfügigere Verschiebungen von H6 und H7 auftreten (Müller *et al.* 2015). Die postulierten Verlagerungen von H2, H6 und H7 wurden ebenfalls durch QM/MM-Simulationen an „aktiviertem“ C1C2 (gemodeltes 13-*cis*-Retinal) bestätigt (Takemoto *et al.* 2015). Die Autoren identifizierten einen sterischen Konflikt zwischen der C₁₃-Methylgruppe des 13-*cis*-Retinal mit dem aromatischen W262 in H6 (W223 in *CrChR2*) als Auslöser für eine Auswärtsbewegung der H6. Eine globale Bewegung der H2 wurde in Fluoreszenz-Anisotropie-Experimenten an markiertem *CrChR2* bestätigt (Volz *et al.* 2016). Alle hier genannten Studien weisen der Bewegung von H2 eine essentielle Funktion für die Ausbildung der Kanalpore zu.

Basierend auf FTIR-Messungen, Homologie-Modellierungen und MD-Simulationen wurde von Kuhne *et al.* (2015) ein detaillierter Mechanismus der Kanalöffnung vorgeschlagen. Das designierte *E90-H2-Tilt-Model* (EHT) sieht eine sequentielle Zwei-Stufen-Kanalbildung vor, in welchem E90 (E129 in C1C2) als Gelenk der H2 fungiert. Nach Isomerisierung des Chromophors (1) klappt das im Zentralen Tor befindliche E90 in Richtung der extrazellulären Seite und deprotoniert (2) (Abbildung 10B), was zu einer Weitung der Kanalpore auf Höhe des Zentralen Tors führt. Das ionische E90 wird durch eine intrahelikale Salzbrücke mit K93 (K132

in C1C2) stabilisiert. Es folgt ein Wassereinstrom vom extrazellulären Halbkanal (**3**, *preopen state*). Anschließend neigt sich das intrazelluläre Ende der H2 um 3.9 Å nach außen (**4**) und die Bindungen innerhalb des Inneren Tors werden gebrochen (**5**). Als Konsequenz kann nun Wasser von der intra- und der extrazellulären Seite in die neu geschaffene Kavität einströmen (**6**) und einen wasserhaltigen Kanal ausbilden (*fully open state*) (Kuhne *et al.* 2015).

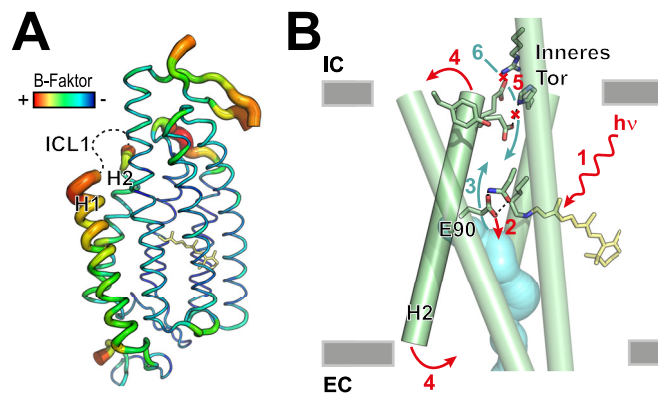


Abbildung 10: Flexible Proteinregionen in der C1C2-Kristallstruktur und das *E90-Helix2-Tilt-Modell*. **A)** C1C2 (PDB: 3ug9) zeigt hohe B-Faktor-Werte an den intrazellulären Enden von H1 und H2. ICL1 ist in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst. **B)** Skizziertes *E90-Helix2-Tilt-Modell* (EHT): Photoisomerisierung des Retinal-Cofaktors (1). Wasserstoffbrückenbindungsänderung von E90; E90 klappt herunter und deprotoniert (2). Wassereinstrom in den Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor (*preopen state*) (3). H2-Auswärtsbewegung um E90 (4). Bruch der Bindungen des Inneren Tors (5). Wassermigration von intrazellulärer Seite (*fully open state*) (6).

Ein alternatives Modell wurde im selben Jahr veröffentlicht. Während das EHT-Modell primär die frühen Konformationsänderungen einschließt, beschreibt das von Lórenz-Fonfría *et al.* erarbeitete Schema, Hydratisierungsänderungen im gesamten Photozyklus (Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2015). Dabei stützten sich die Autoren auf die zeitliche Evolution einer Amid I-Bande ($1648(+) \text{ cm}^{-1}$), welche auf die Wechselwirkung des Proteinrückgrats mit Wasser zurückzuführen ist, und korrelierten es mit zeitaufgelösten elektrophysiologischen Messungen. Neben einer zweistufigen Kanalbildung ($\tau_1 = 10 \mu\text{s}$ (33 %) & $\tau_2 = 200 \mu\text{s}$ (66 %)) identifizierten sie ein Dehydratisierungsereignis ($\tau = 10 \text{ ms}$), welches sie einer Wassermigration aus der Kanalregion in Richtung des Cytoplasmas zuordneten (Kanalschluss).

Auch wenn beide Modelle eine sequentielle Kanalformierung vorsehen, ist der Ort des initialen Wassereinstroms ein anderer. Kuhne *et al.* votieren für die Erweiterung des extrazellulären Halbkanals, wohingegen Lórenz-Fonfría *et al.* einen partiellen Einfluss von der intrazellulären Seite präferieren. Es ist jedoch zu betonen, dass Infrarot-Messungen ohne intensive ortsgerichtete Mutagenese wenig bis gar keine örtliche Auflösung liefern, was eine präzise Verortung der ablaufenden Prozesse spekulativ erscheinen lässt.

1.3.17 Farbverschiebung

Wie bereits in Abbildung 2 angedeutet, vermögen Rhodopsine in einem sehr weiten Spektralbereich zu absorbieren. In manchen *Crustacea* wie z.B. dem Fangschreckenkrebs (engl. *mantis shrimp*) existieren bis zu 16 verschiedene retinalbasierte Farbpigmente, welche eine spektrale Bandbreite von 300 - 700 nm abdecken (Cronin & Marshall 1989; Marshall & Oberwinkler 1999; Cronin *et al.* 2001). Da es sich dabei immer um denselben Cofaktor handelt, ist das Ausmaß an Farbverschiebung wesentlich von der Retinal-Umgebung im Protein abhängig. Ein weiteres Beispiel stellt eine Mutagenesestudie an menschlichem zellulärem Retinol-Bindeprotein II (hCRBP II, engl. *human cellular retinol binding protein II*) dar. Die Autoren waren imstande die Retinal-Bindetasche so zu modifizieren, dass eine kovalente RSB zu all-*trans*-Retinal ausgebildet werden konnte und der Chromophor einzelner Mutanten im Bereich zwischen 425 und 644 nm absorbierte (Wang *et al.* 2012).

Als Resultat jahrzehntelanger Forschung wurden zwei Mechanismen beschrieben, welche maßgeblich an der Farbverschiebung von Rhodopsinen beteiligt sind: 1) Elektrostatische Wechselwirkungen des zumeist negativ geladenen Gegenionenkomplexes und/oder polaren Resten nahe des β -Ionon-Rings mit dem Retinal-Cofaktor 2) Größe des konjugierten Systems, welche durch sterische Effekte verändert werden kann. In den folgenden Abschnitten werden die genannten Effekte im Detail diskutiert.

Elektrostatische Wechselwirkungen

Die bathochrome Verschiebung der Chromophorabsorption innerhalb der meisten Rhodopsine (engl. *opsin shift*) im Vergleich zur „freien RSBH⁺“ (*n*-Butylamin-RSB: $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{-NH}^+$ -Retinyliden, $\lambda_{\text{max}} \sim 440$ nm in Methanol) wird durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung erklärt (Nakanishi *et al.* 1980; Motto *et al.* 1980; Freedman & Becker 1986). Es lassen sich vier vereinfachte, theoretische Szenarien konstruieren, in denen entweder die Gegenionen und/oder polare Aminosäuren nahe des β -Ionon-Rings mit dem Cofaktor interagieren (Abbildung 11).

Im elektronischen Grundzustand (S_0) ist die positive Ladung der protonierten Schiffsschen Base hauptsächlich auf dem Stickstoffatom lokalisiert, wohingegen im ersten angeregten Zustand (S_1) eine Delokalisierung über das gesamte konjugierte System und die Neutralisation der RSB stattfindet (Song *et al.* 1993; Schenkl *et al.* 2005). Je nach Abstand und Anzahl der geladenen Gegenionen, wird die positive Ladung am Stickstoff entsprechend stabilisiert bzw. destabilisiert, d.h. dass sich die energetische Lage des Grundzustands (S_0) entweder absenkt (Abbildung 11A, B) oder anhebt (Abbildung 11C, D). Die wirkenden Coulomb-Kräfte beeinflussen dadurch den Abstand der beiden Niveaus (ΔE). ΔE korreliert mit der Lichtfarbe bzw. Wellenlänge des für die Anregung eines Elektrons aus S_0 benötigten Lichts ($\Delta E = h\nu = hc/\lambda$). Bei Reduzierung von ΔE reicht energieärmere Strahlung für die elektronische Promotion aus und es kommt zu einer bathochromen Verschiebung des Spektrums. Im

Gegensatz dazu führt eine Zunahme von ΔE zu einer hypsochromen Verschiebung, weil für den Elektronentransfer nun energiereicheres, kurzwelligeres Licht benötigt wird.

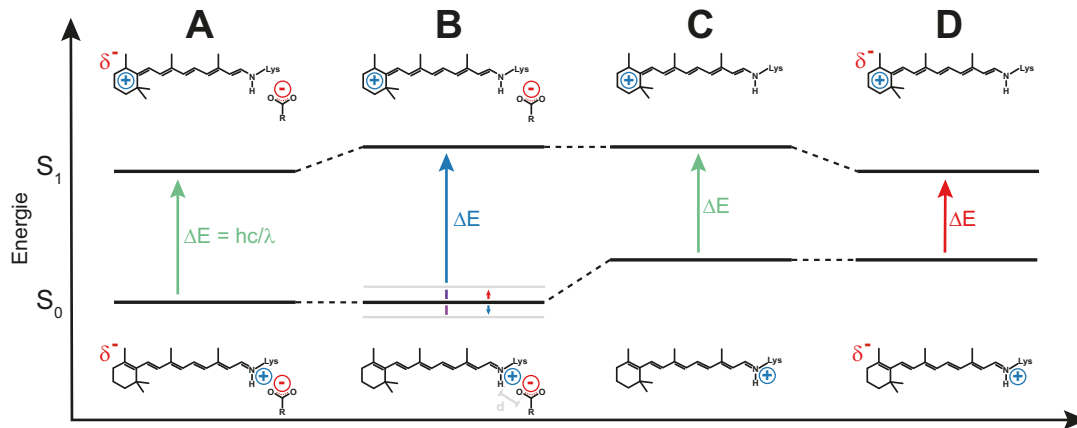


Abbildung 11: Mechanismen der Farbverschiebung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen. Änderungen der Chromophorabsorption am Beispiel eines mikrobiellen Rhodopsins (all-trans-Retinal mit RSBH⁺). Photoaktivierung führt zu der Anhebung eines Elektrons aus dem elektronischen Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Zustand (S_1). Dabei korreliert der Energieunterschied beider Niveaus (ΔE) mit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Während die positive Ladung im S_0 hauptsächlich auf dem Stickstoffatom der RSB lokalisiert ist, wird diese durch eine Bindungsalternanz im S_1 in Richtung der Retinal-Kopfgruppe verschoben. **A)** Stabilisierung (d.h. energetische Absenkung) von S_0 durch Wechselwirkung der RSBH⁺ mit (einem) negativ geladenen Gegenion(en) sowie Stabilisierung von S_1 aufgrund polarer Reste (δ^- , rot) in der Nähe des β -Ionon-Rings. **B)** Stabilisierung von S_0 . Der Abstand (d, grau) der negativ geladenen Gegenionen zur RSBH⁺ korreliert mit dem Ausmaß des stabilisierenden Effekts. **C)** Destabilisierung (d.h. energetische Anhebung) von S_0 aufgrund fehlender Gegenionen. **D)** Destabilisierung von S_0 und Stabilisierung von S_1 . Die Wellenlänge des Anregungslichts wurde anhand von ΔE abgeschätzt. Die Lage der energetischen Niveaus sowie die induzierten Veränderungen sind arbiträr gewählt und basieren auf keinen experimentellen Daten. h, Planck'sches Wirkungsquantum; c, Lichtgeschwindigkeit.

Polare Reste in der Nähe des β -Ionon-Rings können mit der delokalisierten positiven Ladung im S_1 -Niveau wechselwirken und so eine Verkleinerung von ΔE bewirken (Abbildung 11A, D). Die vier vorgestellten Fälle stellen plakativ die Extrema dieser Mechanismen dar, wobei zu betonen ist, dass nicht alle Möglichkeiten gleich wahrscheinlich sind bzw. überhaupt jemals experimentell bestätigt wurden. So ist zum Beispiel Fall C und D (kein(e) Gegenion(en)) bis dato nur auf Basis eines Sequenzvergleichs in HKR2 (Q170 & N293 in Cop6 in *C. reinhardtii*; E123 & D253 in CrChR2) postuliert worden (Luck 2017). Doppelte Gegenionenmutanten von BR (D85N-D212N, E123 & D253 in CrChR2) konnten nur in der Anwesenheit von Chlorid (2 M NaCl) als Surrogat stabilisiert werden (Marti, Rösselet *et al.* 1991).

Am Beispiel zweier mikrobieller Rhodopsine lassen sich die erwähnten Mechanismen gut darlegen. Abbildung 12 zeigt die Kristallstrukturen des Dunkelzustands von C1C2 (PDB: 3ug9) und BR (PDB: 1iw6) (Matsui *et al.* 2002; Kato *et al.* 2012). BR ($\lambda_{\max} \sim 550$ nm) (Marti, Rösselet *et al.* 1991) zeigt im Vergleich zu C1C2 ($\lambda_{\max} \sim 480$ nm) (Kato *et al.* 2012) ein um ca. 70 nm rot-verschobenes Absorptionsspektrum. Auf molekularer Ebenen lassen sich drei Beobachtungen feststellen, welche diese immense Bathochromie erklären könnten. Zum ersten sind die Abstände der beiden Gegenionen (D85 & D212, Abbildung 12B) zur RSBH⁺ im BR

größer als für die homologen Reste in C1C2 (E162 & D292, Abbildung 12A) und können damit die positive Ladung auf dem Stickstoff schlechter stabilisieren. Im Gegensatz zu BR trägt C1C2 einen weiteren polaren Rest (S295; A215 in BR) in der Nähe der RSBH⁺, welcher zusätzlich zur Stabilisierung beitragen könnte. Des Weiteren befinden sich zwei polare Aminosäuren (S141 & T142, Abbildung 12D) in räumlicher Nähe zum β -Ionon-Ring von BR, welche durch Wechselwirkung mit der delokalisierten positiven Ladung den S₁ energetisch absenken könnten. Beide Effekte verkleinern den energetischen Abstand der elektronischen Niveaus (ΔE) zueinander und könnten so die bathochrome Farbverschiebung des BR erklären.

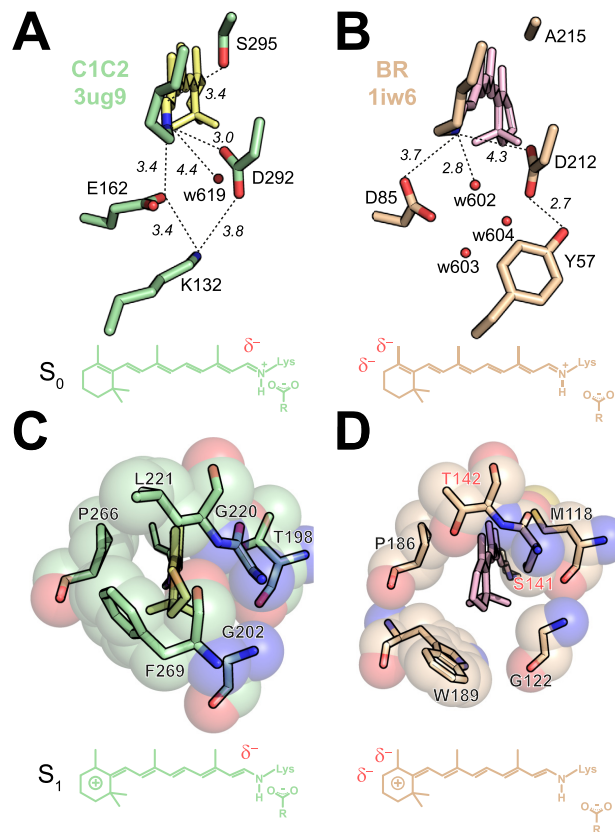


Abbildung 12: Farbverschiebung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen. Strukturmodelle von C1C2 (PDB: 3ug9) und BR (PDB: 1iw6) mit Fokus auf deren Gegenionenkomplexen (**A**, **B**) und den Regionen um den β -Ionon-Ring des Retinal-Moleküls (**C**, **D**). Die elektrostatische Situation des Retinal-Cofaktors im elektronischen Grundzustand (S₀) und im ersten angeregten Zustand (S₁) sind skizziert. Abstände in Å.

Die auftretenden Effekte wurden mittels computergestützter Rechnungen auf Basis einer BR-Röntgenstruktur im Vergleich zu C₇ChR1 & 2 quantifiziert. Dabei fiel das Ausmaß auf die Aktivierungsenergie der Gegenionensubstitution D85E (E123 in C1C2) mit nur 0.06 eV im Verhältnis zu den β -Ionon-Ring-Mutationen S141G und T142L (G220 & L221 in C1C2) mit gesamt 0.15 eV deutlich geringer ins Gewicht. Die Autoren zeigten zudem weitere Aminosäuresubstitutionen auf, u.a. BR M20 (0.4 eV), T90 (0.1 eV) und A215 (0.08 eV) (E87,

C167 & S295 in C1C2), welche zu den großen spektralen Unterschieden der beiden Photorezeptoren beitragen könnten (Welke *et al.* 2011).

Gegenionenkomplex

Einen Überblick über die Konservierung des Gegenionenkomplexes gibt der Sequenzvergleich in Abbildung 13. In den meisten ChRs sind zwei saure Aminosäuren sowie ein alkalischer Rest Teil des komplexen Gegenions, jedoch existieren auch ChRs, welche nur einen aciden Rest (ChR1 aus *Dunaliella salina*, DsChR1 & Chronos aus *Stigeoclonium helveticum*) bzw. ein ungeladenes aromatisches Phenylalanin anstelle des alkalischen Lysins tragen (CaChR1 & Chrimson aus *Chlamydomonas noctigama*). Zusätzlich weisen alle blau-absorbierenden ChRs inkl. CaChR1 ein polares Serin in der Nähe des C₁₅-Kohlenstoffs des Retinals auf (*cf.* Abbildung 12A), während die grün- bis orange-absorbierenden ChRs und BR ein Alanin an homologer Stelle tragen.

	λ_{\max} / nm	H2	H3	H7
		K93	E123	D253 S256
PsChR2	442	74 F C K I V 78	104 Y A E W L 108	235 A D L L S K 240
C1C2	470	130 M I K F I 134	160 Y A E W L 164	291 I D L M S K 296
CrChR2	470	91 M V K V I 95	121 Y A E W L 125	252 I D L M S K 257
Chronos	488	108 L V K C F 112	138 Y S M W L 142	269 L D L I S K 274
DsChR1	490	146 L V H I A 150	176 Y S A W L 180	308 L E I F S K 313
CaChR1	518	137 L V F I C 141	167 Y S E W L 171	298 G D L I S K 303
ReaChR	527	131 M M K S I 135	161 Y G E W L 165	292 L D L I A K 297
VcChR1	535	86 M M K S I 90	116 Y G E W L 120	247 L D L I A K 252
C1V1	539	130 M I K F I 134	160 Y G E W L 164	291 L D L I A K 296
Chrimson	584	133 V L F V T 137	163 Y F E W L 167	294 C D I I A K 299
HsBR	551	54 F T M Y L 58	83 Y A D W L 87	211 L D V S A K 216

■	sauer
■	alkalisch
■	polar
■	neutral, unpolar

Abbildung 13: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren Gegenionenkomplexen. Nomenklatur von CrChR2 (farbige Zahlen). Farben symbolisieren den chemischen Charakter der jeweiligen Aminosäure (*cf.* Legende). Referenzen für Absorptions- bzw. Aktionsspektren siehe Tabelle 5. Für genaue Gattungsbezeichnungen sowie Protein-IDs siehe Abbildung 5.

Die Neutralisation der Gegenionen führt in vielen Rhodopsinen zu bathochromen Farbverschiebungen (Tabelle 5). Diese lassen sich durch die Destabilisierung des elektronischen Grundzustands S_0 erklären. Dabei ist das Ausmaß der Farbverschiebung in jedem ChR unterschiedlich stark ausgeprägt. Während Threonin- und Glutamin-Substitutionen von E123 in CrChR2 (E162 in C1C2) das Aktions- bzw. Absorptionsspektrum um 20 - 25 nm in den längerwelligen Spektralbereich verschieben (Gunaydin *et al.* 2010; Govorunova *et al.* 2013; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015), ist der Effekt beim zweiten Gegenion (D253N) weniger stark ausgeprägt (16 nm). In dem blau-absorbierenden ChR2 aus *Platymonas subcordiformis* (PsChR2, λ_{\max} = 442 nm) ist sogar eine Verschiebung von 31 bzw. 17 nm (E106Q, D236N) zu verzeichnen (Govorunova *et al.* 2013). C1C2-E162Q zeigt maximale Photoströme bei Belichtung mit 493 nm und D293N bei 485 nm, was im Vergleich zum WT (λ_{\max} = 476 nm) eine spektrale Rotverschiebung von 17 bzw. 9 nm darstellt (Li *et al.* 2014) und sich gut mit UV-vis-Spektren der isolierten Proteine in Einklang bringen lässt (Verschiebung von 11 bzw. 4 nm) (Ito *et al.* 2014).

In allen vorher genannten Fällen beeinflussen beide Gegenionen die Lage der Aktions- bzw. Absorptionsmaxima. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass beide in ionischer Form vorliegen und zur Stabilisierung der RSBH⁺ beitragen. Allerdings verursacht die Neutralisation der E123-analogen Glutaminsäure größere spektrale Verschiebungen, was eine kleinere Distanz dieses Restes zum positiven Stickstoff des Cofaktors suggeriert. Diese Überlegungen lassen sich gut mit computerbasierten Rechnungen an C1C2 untermauern, in denen der Anteil der Aktivierungsenergie bezogen auf E162 um ca. 3 kcal/mol größer ist als für D292 (Kamiya *et al.* 2013).

Im Gegensatz zu den vorhergenannten ChRs induziert die Neutralisation der Gegenionen in CaChR1, C1V1 und Chrimson hypsochrome Verschiebungen (Tabelle 5). Dabei ist in CaChR1 und Chrimson der Effekt der D253-analogen Aminosäure (D292 in C1C2) stärker ausgeprägt (Li *et al.* 2014; Vierock *et al.* 2017). Manche ChRs weisen nur ein protonierbares Gegenion in der Nähe der RSBH⁺ auf. DsChR1 trägt anstelle der Glutaminsäure 162 ein Alanin, welches bei Mutagenese (A178E) das Aktionsspektrum um ca. 20 nm in den roten Bereich verschiebt (Zhang *et al.* 2011; Li *et al.* 2014). Die beiden zuletzt geschilderten Beobachtungen lassen sich nicht ohne Weiteres mit den in Abbildung 11 dargestellten Mechanismen erklären.

Tabelle 5: Farbverschiebungen in Rhodopsinen durch Mutagenese des Gegenionenkomplexes. Nomenklatur von CrChR2 (*fette Zahlen*). Zahlenwerte entsprechen den Maxima der Aktions- (1) bzw. Absorptionsspektren (2) (in nm). Siehe Bildunterschrift Abbildung 5 für die organismische Herkunft und taxonomische Eingruppierung der einzelnen Rhodopsine.

Rhodopsin	wt	K93	E123	D253	S256	Referenz
PsChR2	442	455 (K76F)	473 (E106Q)	459 (D236N)		Govorunova <i>et al.</i> , 2013 ¹
C1C2	476 472	489 (K132F) 479 (K132A)	493 (E162Q) 483 (E162Q)	485 (D292N) 476 (D292N)		Li <i>et al.</i> , 2014 ¹ Ito <i>et al.</i> , 2014 ²
CrChR2	470 478 468		490-495 (E123T) 491 (E123T) 491 (E123Q)	484 (D253N)		Gunaydin <i>et al.</i> , 2010 ¹ ; Berndt <i>et al.</i> , 2011 ¹ Lórenz-Fonfria, Schultz <i>et al.</i> , 2015 ² Govorunova <i>et al.</i> , 2013 ¹ Berndt, 2011 ¹
		rote Anhebung (K93Q)				
Chronos	488 500		496 (M140E) 472/356 (M140D)			Teil dieser Arbeit ² Klapoetke <i>et al.</i> , 2014 ¹
DsChR1	490 490 462/487		510 (A178E) 510 (A178E) 480 (A178E/E309Q)	495 (E309D)		Zhang <i>et al.</i> , 2011 ¹ Li <i>et al.</i> , 2014 ¹ Li <i>et al.</i> , 2014 ¹ Vierock, 2009 ²
CaChR1	518	482 (F139K)	513 (E169Q)	509 (D299N)		Li <i>et al.</i> , 2014 ¹
ReaChR	527 537	531 (K133azF)	530 (E163T) 535 (E163T)	528 (D293N) 524 (D293N)		Teil dieser Arbeit ² Kaufmann <i>et al.</i> , 2017 ¹
C1V1	539 515		525 (E162T) 534 (E162A)		521 (A295S)	Prigge, 2012 ¹ Teil dieser Arbeit ²
Chrimson	562 585 547	526 (F135K) 520 (F135K)	557 (E165A) 565 (E165A)	524 (D295A)		Urmann <i>et al.</i> , 2017 ² Vierock <i>et al.</i> , 2017 ¹ Teil dieser Arbeit ²
CsChrimson	524					Teil dieser Arbeit ²
HsBR	551		595 (D85N)	560 (D212N)		Marti, Rösselet <i>et al.</i> , 1991 ² Govindjee <i>et al.</i> , 1995 ²
HwBR	552	548 (Y57F)			539 (A223T)	Sudo <i>et al.</i> , 2013 ²

Des Weiteren ist eine Farbverschiebung bzw. Beeinflussung der elektronischen Niveaus durch Mutagenese der K93-homologen Position zu beobachten. Die Einführung einer neutralen

Aminosäure an dieser Stelle in die blau-absorbierenden ChRs *P_s*ChR2, C1C2 und *C_r*ChR2 verursacht eine spektrale Rotverschiebung (Tabelle 5). Da die beiden rot-verschobenen Varianten *Ca*ChR1 ($\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$) (Li *et al.* 2014) und Chrimson ($\lambda_{\text{max}} = 562$ bzw. 585 nm) (Urmann *et al.* 2017; Vierock *et al.* 2017) an der korrespondierenden Stelle bereits einen neutralen Rest (Phenylalanin) tragen, könnte die spektrale Lage zumindest teilweise erklärt werden. Widersprüchliche Ergebnisse liefern dagegen QM/MM-Rechnungen, welche blau-verschobene Spektren für K132-Mutanten in C1C2 prognostizieren (Kamiya *et al.* 2013; Sneskov *et al.* 2013). In einer breit angelegten Mutagenesestudie wurde der Einfluss des K93-homologen Restes auf das Absorptionsverhalten in mehreren ChRs untersucht. Die Autoren postulierten, dass K93 die Richtung der spektralen Verschiebung bei Neutralisation der Gegenionen definieren würde (Li *et al.* 2014). In „hoch effizienten“ (engl. *high efficiency*) ChRs wie *P_s*ChR2 und C1C2, welche nativ ein homologes Lysin tragen, wurden Rotverschiebungen bei Gegenionenmutationen verzeichnet (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu wurden bei „wenig effizienten“ (engl. *low efficiency*) ChRs (kein natives Lysin) wie *Ca*ChR1 (und *D_s*ChR1) hypsochrome Farbverschiebungen verbucht (Tabelle 5). Laut dieser Studie kontrolliert K93 die effektive Ladung der Gegenionen mittels elektrostatischer Wechselwirkung und Modulation der pK_s -Werte der jeweiligen Reste. In Abwesenheit bzw. Mutation von K93 (Reduktion einer positiven Ladung im Gegenionenkomplex) kommt es bei Neutralisation eines Gegenions zu einer drastischen Reduktion des pK_s -Wertes des jeweiligen anderen Gegenions, welches infolgedessen deprotonieren könnte und eine negative Ladung nahe der RSB bildet. Diese könnte in Abhängigkeit des Abstands die RSBH⁺ (besser) stabilisieren. Da in *Ca*ChR1 (Ogren *et al.* 2014; Ogren, Yi, Mamaev, Li, Spudich *et al.* 2015; Ogren, Yi, Mamaev, Li, Lugtenburg *et al.* 2015) und Chrimson (Vierock *et al.* 2017) bei physiologischem pH-Wert eines der beiden Gegenionen (E169 in *Ca*ChR1; E165 in Chrimson) protoniert vorliegt, verursacht die Neutralisation des jeweiligen anderen Gegenions (*Ca*ChR1-D299N, Chrimson-D295N) die Deprotonierung der konservierten Glutaminsäure und eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums ist zu beobachten.

β -Ionon-Ring-Umgebung

Die schon im Rahmen von Abbildung 12 besprochenen Wechselwirkungen des β -Ionon-Rings mit der Retinal-Bindetasche sind auch bei anderen ChRs zu beobachten. Abbildung 14 zeigt einen Sequenzvergleich relevanter Reste und Tabelle 6 fasst einige aus der Literatur bekannte Mutationen zusammen, in denen die Farbverschiebung diesem Mechanismus zugrunde liegt.

Anstelle der zwei unpolaren Aminosäuren (G181 und L182) in H5 von blau-absorbierenden ChRs (C1C2, *C_r*ChR2, Chronos & *D_s*ChR1), tragen grün- (*V_s*ChR1, C1V1 & ReaChR) bis orange-absorbierende Varianten (Chrimson) sowie BR eine bis zwei polare Reste an der Retinal-Kopfgruppe. Demzufolge verursacht die Einführung einer polaren Gruppe in das bei 458 nm absorbierende C1C2 (G220S) eine 13 nm große Rotverschiebung (Schneider *et al.* 2015). Die damit einhergehende Verkleinerung der Aktivierungsenergie in der Mutante lässt sich

auch mithilfe von quantenmechanischen Rechnungen, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß (-0.25 kcal/mol), vorhersagen (Kamiya *et al.* 2013). In Analogie zu C1C2 ist das Aktionsspektrum der L221T-Mutante der CrChR1/VcChR1-Chimäre (C1V1) gegenüber dem Wildtyp um 7 nm in den roten Spektralbereich verschoben (Prigge 2012; Prigge *et al.* 2012). Nahezu unverändert ist jedoch das Aktionsspektrum einer analogen Substitution in dem CrChR1-VcChR1/2-Hybrid ReaChR (engl. *red-activatable ChR*), obwohl das eingeführte Cystein in dem bis dato am meisten rot-verschobenen Kanalrhodopsin Chrimson konserviert vorliegt (Grimm 2014). Bei Wegnahme der einen bzw. beider polaren Aminosäuren in C1V1 (S220G) sowie in BR (S141A, T142V) zeigt sich eine deutliche Verschiebung zu energiereicherem Licht. Die dabei induzierte Blauverschiebung ist bei der S220-homologen Position stärker ausgeprägt (Marti, Otto *et al.* 1991; Prigge 2012; Prigge *et al.* 2012). Auch in diesem Fall lässt sich der experimentell beobachtete Trend zuverlässig mit quantenmechanischen Rechnungen prognostizieren (Welke *et al.* 2011).

	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	H4										H5										
		T159					G163					G181					L182					
PsChR2	442	140	L	G	G	I	C	M	A	V	T	148	162	V	I	G	C	C	Y	167	<div><div></div>sauer</div> <div><div></div>alkalisch</div> <div><div></div>polar</div> <div><div></div>neutral, unpolar</div>	
C1C2-GA	455	196	I	G	G	I	V	W	A	T	204	218	L	M	G	L	C	Y	223			
C1C2	470	196	I	G	T	I	V	W	G	T	204	218	L	M	G	L	C	Y	223			
CrChR2	470	157	I	G	T	I	V	W	G	A	165	179	C	L	G	L	C	Y	184			
Chronos	488	174	I	G	N	I	V	W	G	I	182	196	M	I	G	L	F	Y	201			
DsChR1	490	212	I	G	T	I	V	F	G	T	220	235	T	I	G	L	L	Y	240			
CaChR1	518	203	I	A	T	I	V	F	G	I	211	225	L	L	G	F	T	M	230			
ReaChR	527	197	V	G	C	I	V	W	G	A	205	219	L	I	S	L	S	Y	224			
VcChR1	535	152	V	G	C	I	V	W	G	A	160	174	L	I	S	L	S	Y	179			
C1V1	539	196	V	G	C	I	V	W	G	A	204	218	L	I	S	L	S	Y	223			
Chrimson	584	199	V	G	M	I	V	F	G	M	207	221	I	V	S	C	I	Y	226			
HsBR	551	116	G	I	M	I	G	T	G	L	V	124	139	A	I	S	T	A	144			

■	sauer
■	alkalisch
■	polar
■	neutral, unpolar

Abbildung 14: Sequenzvergleich einiger Rhodopsine mit Fokus auf deren Aminosäuren am β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors. Nomenklatur von CrChR2 (*farbige Zahlen*). Farben symbolisieren den chemischen Charakter der jeweiligen Aminosäure (*cf.* Legende). Referenzen für Absorptions- bzw. Aktionsspektren siehe Tabelle 6. C1C2-GA, C1C2 mit T198G- und G202A-Mutationen. Siehe Bildunterschrift Abbildung 5 für die organismische Herkunft und taxonomische Eingruppierung der einzelnen Rhodopsine.

Tabelle 6: Farbverschiebungen in Rhodopsinen durch Mutagenese von Aminosäuren am β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors. Nomenklatur von CrChR2 (*fette Zahlen*). Zahlenwerte entsprechen den Maxima der Aktions- (1) bzw. Absorptionsspektren (2) (in nm). HwBR, *Haloquadratum walsbyi* Bakteriorhodopsin, UniProtKB/Swiss-Prot: Q18DH8.1. Siehe Bildunterschrift Abbildung 5 für die organismische Herkunft und taxonomische Eingruppierung der hier nicht genannten Rhodopsine.

Rhodopsin	wt	T159	G163	G181	L182	Referenz
C1C2	458 476	455 (T198G/G202A)		471 (G220S)		Schneider et al., 2015 ¹ Kato, Kamiya et al., 2015 ²
CrChR2	460	463 (T159C)				Schneider, 2014 ¹
C1V1	539	538 (C198T)		526 (S220G)	546 (L221T)	Prigge, 2012 ¹ ; Prigge et al., 2012 ¹
ReaChR	533				535 (L222C)	Grimm, 2014 ¹
HsBR	551			540 (S141A)	546 (T142V)	Marti, Otto et al., 1991 ²
HwBR	552	543 (M126A) 487 (M126A/G130V)				Sudo et al., 2013 ³ Kato, Kamiya et al., 2015 ²

Koplanarität

Der letzte Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Geometrie des Retinal-Chromophors, vor allem der räumlichen Anordnung der Polyenkette in Bezug auf den β -Ionon-Ring. Der Energieunterschied zwischen S_0 und S_1 (ΔE) ist invers proportional zur Größe des konjugierten Systems (je größer das konjugierte System, desto kleiner ΔE). Dabei vermögen die orthogonal zur Polyenebene befindlichen p_z -Orbitale der Kohlenstoffatome am besten zu überlappen, wenn alle parallel zueinander orientiert sind. Das größte Überlappungsintegral sowie das kleinste ΔE sind in einem koplanaren Retinal-Molekül gewährleistet, d.h. die Polyenkette liegt in einer Ebene mit der Doppelbindung der Kopfgruppe und der aufgespannte Diederwinkel α der $C_5=C_6-C_7=C_8$ -Einheit ist entweder 0 oder 180° . In der 6-*s-trans*-Anordnung des Retinals wird eine koplanare Konfiguration mit einem Diederwinkel von $\sim 180^\circ$ erreicht (Abbildung 15A).

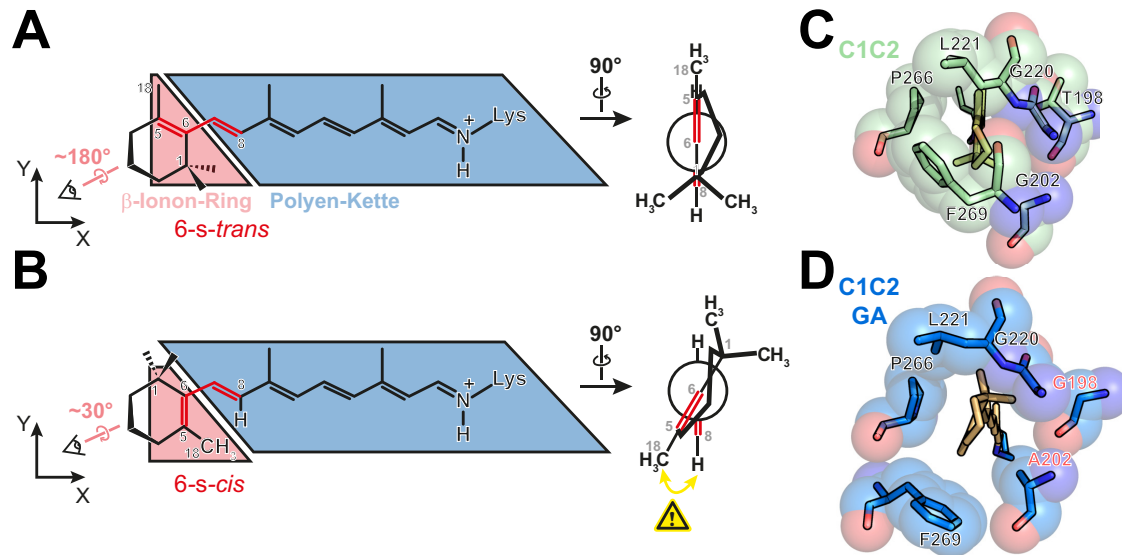


Abbildung 15: Koplanarität von Polyenkette und β -Ionon-Ring des Retinal-Cofaktors. Strukturelle Modelle des gebundenen Retinal-Cofaktors mit Fokus auf dem Diederwinkel (α , rosa) der $C_5=C_6-C_7=C_8$ -Bindungen. Die Orientierung der Ebenen der Polyen-Kette (blau) und des β -Ionon-Rings (rot) innerhalb der 6-*s-trans*- (A, C) und der 6-*s-cis*- Konformation (B, D) sind dargestellt (links). Newman-Projektion mit Blick auf die C_6-C_7 -Einfachbindung (Mitte). In der 6-*s-trans*-Konformation wird eine koplanare Orientierung mit einem Diederwinkel von nahezu 180° ermöglicht. Hingegen wird aufgrund der sterischen Wechselwirkung zwischen der C_{18} -Methylgruppe und dem Wasserstoffatom an C_8 in der 6-*s-cis*-Konformation eine Rotation um ca. 30° im Uhrzeigersinn induziert. Struktur von C1C2 (C, $\alpha = 177.7^\circ$, PDB: 3ug9) und C1C2-GA (T198G und G202A) (D, $\alpha = -31.4^\circ$, PDB: 4yzi) mit Blick auf die Kopfgruppe des Retinals.

In der 6-*s-cis*-Anordnung (konserviert in tierischen Rhodopsinen (Ernst *et al.* 2014)) zwingt der sterische Konflikt zwischen der räumlich anspruchsvollen C_{18} -Methylgruppe und dem C_8 -Wasserstoffatom den β -Ionon-Ring in eine um ca. 30° aus der Polyenebene rotierte Konformation (Abbildung 15B). Aufgrund der Drehung um die C_6-C_7 -Einfachbindung ist die Koplanarität aufgehoben und ΔE vergrößert. Obwohl 6-*s-cis*-Retinal in Lösung eine höhere Stabilität als sein *trans*-Stereoisomer aufweist (Childs *et al.* 1987), ist die räumliche Beschaffenheit

der Retinal-Bindetasche maßgeblich an der Konformation der prosthetischen Gruppe innerhalb des Proteins beteiligt.

Am Beispiel der beiden ChR-Kristallstrukturen lässt sich sehr gut der Einfluss der Proteinumgebung auf die Retinal-Geometrie diskutieren. Im C1C2 wird das Retinal-Molekül durch sechs Aminosäuren in seiner 6-s-*trans*-Konfiguration fixiert (Abbildung 15C). Durch Mutagenese von nur zwei Resten nahe der Kopfgruppe (T198G, G202A, C1C2-GA) wird eine entsprechende Kavität für die stabilere 6-s-*cis*-Anordnung geschaffen (Abbildung 15D). Die Aufhebung der Koplanarität in der C1C2-GA-Mutante führt zu einer Blauverschiebung im Absorptionsspektrum von ca. 20 nm (Kato, Kamiya *et al.* 2015). Analoge Mutationen verursachen in dem Bakteriorhodopsin aus *Haloquadratum walsbyi* (HwBR) ähnlich signifikante Verschiebungen in den kurzwelligen Spektralbereich (Sudo *et al.* 2013; Kato, Kamiya *et al.* 2015). Basierend auf der Sequenzhomologie (Abbildung 14) zu der C1C2-GA-Variante könnte für P₃ChR2 und dem ChR aus *Tetraselmis striata* (nicht gezeigt, GenBank: AHH02155) eine 6-s-*cis*-Konformation des Cofaktors angenommen werden, welche die blau-verschobenen Aktionsspektren ($\lambda_{\text{max}} = 430 - 440 \text{ nm}$) erklären könnte.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass die Retinal-Bindetasche auch eine Aufhebung der Planarität der Polyenkette induzieren kann. In C1C2 hat dieser Effekt aber nur eine geringfügige Reduktion der Konjugation zur Folge (Sneskov *et al.* 2013).

1.3.18 Kanalrhodopsin als optogenetisches Werkzeug

Der Einsatz von lichtgesteuerten Ionenkanälen bzw. Pumpen zur Beeinflussung der Ionenhomöostase innerhalb tierischer Gewebe hat das neurophysiologische Arbeiten revolutioniert und einen neuen Forschungszweig geschaffen, die Optogenetik. Während frühere Versuchsaufbauten invasive Maßnahmen mit zum Teil implantierten Elektroden vorsahen, ermöglicht die zielgerichtete Integration von Photosensoren in bestimmte Gewebestrukturen dem Experimentator nahezu nativ bzw. minimal invasiv zu operieren. Des Weiteren übertreffen die lichtbasierten Methoden ihre Vorgänger in jeglicher zeitlicher und räumlicher Präzision und wurden erfolgreich in Neuronen, *Caenorhabditis elegans* und Hühnerembryos angewendet (Boyden *et al.* 2005; X. Li *et al.* 2005; Nagel *et al.* 2005; Ishizuka *et al.* 2006).

Doch welche Eigenschaften prädestinieren Kanalrhodopsin für optogenetische Anwendungen? Zuerst ist anzumerken, dass es ein kompaktes, relativ kleines (~200 AS, Rhodopsinteil) Zwei-Komponenten-System aus Sensor und Effektor innerhalb eines Proteins darstellt. ChRs haben hohe Quantenausbeuten ($\Phi = 0.3 - 0.7$) (Zhang *et al.* 2011), moderate bis hohe Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 35.000 - 70.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Abbildung 2) und eine vernachlässigbare Dunkelaktivität.

Im Gegensatz zu Invertebraten-Rhodopsinen (Typ II) verbleibt der Cofaktor während des gesamten Photozyklus am Apoprotein gebunden und dissoziiert nicht. Isomerisierung und Reisomerisierung sind damit vollständig reversibel, was einen schnelleren Durchlauf des Photozyklus ermöglicht, sowie die Rekrutierung eines „neuen“ Cofaktors (wie bei

Typ II-Rhodopsinen) obsolet macht. Die funktionelle Expression innerhalb eines bestimmten Gewebetyps limitiert den Einsatz jedes optogenetischen Werkzeugs. Während die H^+ -Pumpe BR nicht ohne Weiteres in neuronalen Systemen exprimiert werden kann, zeigen ChRs wie C1V1 und ReaChR gute Membranständigkeit und hohe Photoströme (Yizhar *et al.* 2011; Lin *et al.* 2013). Überraschenderweise bedarf es bei ChR-basierten Anwendungen nicht der exogenen Zugabe von Retinal, da viele Gehirnregionen suffiziente intrinsische Retinal-Reserven aufweisen, um das exprimierte Apoprotein quantitativ zu rekonstituieren (Zhang *et al.* 2006).

Obwohl einige ChR-Varianten im Vergleich zu H^+ -Pumpen wie BR langsamere Photozyklen aufweisen, transportieren sie 10 - 100 Mal mehr Ladungsträger pro Zyklus (BR: 1 Ion/Zyklus; *CrChR2*: 10 - 100/Zyklus) (Harz *et al.* 1992; Hegemann 2008), wodurch das Membranpotential deutlich stärker verändert werden kann. Um den jeweiligen anwendungsbezogenen Bedürfnissen gerecht zu werden, haben Mutagenesestudien sowie intensive Genomanalysen ChR-Varianten zu Tage befördert, welche beschleunigte (ChETAs wie *CrChR2*-E123T & C1V1-E122T-E162T sowie Chronos) (Gunaydin *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011; Klapoetke *et al.* 2014) bzw. deutlich langsamere Kinetiken (SFOs, z.B. *CrChR2*-C128A/S/T & -D156A/C/N) (Berndt *et al.* 2009; Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011; Wietek *et al.* 2014; Dawydow *et al.* 2014) aufweisen.

Trotz der geringen Promiskuität der kationen- sowie anionenleitenden ChRs bestand der Wunsch nach selektiveren Varianten. Der besondere Fokus in den nachfolgenden Mutationsstudien lag auf Ionen, welchen unter physiologischen Bedingungen einen größtmöglichen Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum aufweisen (Ca^{2+} & K^+). Ein lichtinduzierter Einstrom des sekundären Signalmoleküls Ca^{2+} könnte in Neuronen spezifische Signalkaskaden regulieren, wohingegen ein auswärtsgerichteter K^+ -Transport die Zellmembran enorm hyperpolarisieren würde. Durch Mutation eines Restes in H3 (*CrChR2*-L132C) wurde eine Variante geschaffen, welche dreimal mehr Ca^{2+} als der Wildtyp leitet (Kleinlogel, Feldbauer *et al.* 2011), jedoch besteht bis zum heutigen Zeitpunkt kein publizierter Nachweis über einen rhodopsinbasierten K^+ -selektiven Kanal.

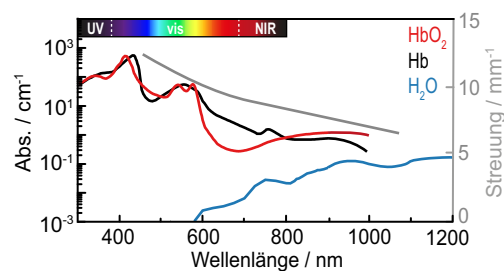


Abbildung 16: Attenuation von einstrahlendem Licht an biologischen Geweben. Hämoglobin ohne (Hb) bzw. mit gebundenem Sauerstoff (HbO₂) zeigt eine prominente Absorption im sichtbaren Teil des Lichtspektrums während Wasser (blau) erst im IR absorbiert. Lichtstreuung an der Grauen Substanz des Zentralnervensystems ist dargestellt (grau). Spektren sind adaptiert aus Smith & Smith (2014) und Ziegler & Möglich (2015).

Im Rahmen der Anwendung innerhalb neuronaler Systeme, vor allem im Gehirn, unterliegen optogenetische Experimente aber gewissen physikalischen, anatomischen und

gewebespezifischen Limitationen. Zum einen wird die Eindringtiefe des einstrahlenden Lichtpulses durch Streuphänomene an lipidhaltigen Komponenten wie z.B. der Grauen Substanz im Zentralnervensystem reduziert. Das Ausmaß der Streuung ist dabei wellenlängenabhängig und tritt besonders stark bei kurzwelliger Strahlung auf (Abbildung 16). Zum anderen wird die Tiefenpenetration durch die Absorption von Hämoglobin (Hb) und anderen Farbpigmenten sowie von Wasser im infraroten Wellenlängenbereich abgeschwächt (Tromberg *et al.* 2000; Marblestone *et al.* 2013).

Trotz der genannten Limitationen sind die blau-absorbierenden ChRs *CrChR2* und *CrChR2-H134R* bis zum heutigen Tage die meist verwendeten ChR-Varianten für optogenetische Anwendungen (Wietek & Prigge 2016). Genomsequenzierungen von diversen Algen offenbarten einige ChRs mit längerwelligen Absorptionsmaxima wie z.B. ChR1 aus *Volvox carteri* (*VcChR1*, $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$) (Zhang *et al.* 2008), ChR1 aus *Mesostigma viride* (*MvChR*, $\lambda_{\text{max}} = 531 \text{ nm}$) (Govorunova *et al.* 2011), ChR1 aus *Chlamydomonas augustae* (*CaChR1*, $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) (Hou *et al.* 2012) und Chrimson ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$) (Klapoetke *et al.* 2014). *VcChR1* und *MvChR* zeigten eine schlechte Expression bzw. Membranlokalisation oder verursachten nur geringe lichtinduzierte Ströme (Zhang *et al.* 2008; Stehfest & Hegemann 2010; Govorunova *et al.* 2011; Tomita *et al.* 2014). Durch Austausch des N-Terminus sowie ganzer Transmembranhelices wurden *VcChR1*-Chimären generiert, welche neben dem rot-verschobenen Absorptionsspektrum auch eine gute Expression und Lokalisation gewährleisteten. Dazu zählen C1V1 (Yizhar *et al.* 2011; Prigge *et al.* 2012), ReaChR (engl. *red-activatable ChR*) (Lin *et al.* 2013) sowie m*VcChR1* (Tomita *et al.* 2014). Alle drei Hybride erlaubten die Photoaktivierung von Zellen mit rotem Licht (630 - 655 nm). Das optimale spektrale Anregungsfenster liegt jedoch im nahen IR-Bereich (680 - 900 nm) und ist bis dato nur mit dem am weitesten rot-verschobenen (Cs)Chrimson vereinbar (Klapoetke *et al.* 2014).

In 2013 wurde eine Methode entwickelt, sich der Hauptstreuungsquelle, der Lipide, in komplexen Geweben z.B. Mäusegehirnen zu entledigen und mikroskopische Aufnahmen ganzer zellulärer Strukturen mit einer bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglichen Tiefenauflösung zu realisieren, ohne die Probe in dünne Scheiben zerlegen zu müssen. Das so genannte CLARITY ist eine Kombination aus Hybridisierung der biologischen Gewebe mit einem Polyacrylamid-Hydrogel und nachfolgender Entfernung der Lipide durch Elektrolyse (Chung *et al.* 2013; Chung & Deisseroth 2013). Obwohl es die native Umgebung der organischen Gewebe nahezu aufrechterhält, verspricht es wenig Potential als vorbereitende Maßnahme vor optogenetischen Anwendungen, da es die Membranstruktur zerstört und daher vor allem nicht mit *in-vivo*-Studien kompatibel ist.

Eine weitere Möglichkeit die Eindringtiefe in biologischen Proben zu erhöhen, stellt die Zwei-Photonen-Anregung (2P) dar. Da in diesem Fall zwei infrarote Photonen anstelle von einem sichtbaren Photon (1P) für die Stimulation der Photorezeptoren verwendet wird, widerfahren diese einer geringeren Abschwächung durch das Gewebe. Obwohl eine erfolgreiche 2P-Aktivierung ($\lambda = 920 \text{ nm}$) an *CrChR2* demonstriert wurde (Rickgauer & Tank 2009), zeigen die rot-verschobenen Varianten höhere 2P-Absorptionsquerschnitte und lassen sich mit

langwelliger IR-Strahlung anregen (Chronos, $\lambda = 1030$ nm (Ronzitti *et al.* 2017); C1V1-E162T, $\lambda = 1040 - 1064$ nm (Prakash *et al.* 2012; Packer *et al.* 2012); ReaChR, $\lambda = 1030$ nm (Chaigneau *et al.* 2016) bzw. 1250 nm (Hsiao *et al.* 2015)). Ouzounov *et al.* berichteten sogar von der Verwendung von Drei-Photonen-Absorption (3P) für mikroskopische Zwecke. Durch Anregung mit drei Photonen einer Wellenlänge von 1300 nm konnte eine Eindringtiefe von ~ 1 mm in intakten Mäusegehirnen erzielt werden (Ouzounov *et al.* 2017).

Tabelle 7: Kanalrhodopsin-Varianten für optogenetische Anwendungen. CatCh, engl. *calcium translocating channelrhodopsin*; 2P, Zwei-Photonen; ChloC, engl. *chloride-conducting* ChR; iC1C2, engl. *inhibitory* C1C2.

ChR	Vorteile	Referenzen
CrChR2-H134R	geringere Inaktivierung, geringere H^+ -Leitfähigkeit, erhöhte Expression	Nagel <i>et al.</i> , 2005; Lin <i>et al.</i> , 2009; Stehfest & Hegemann, 2010
ChETA-Varianten: CrChR2-E123T/A/Q C1V1-E162T bzw. -ET/ET	beschleunigter Photozyklus, hohe Belichtungsfrequenzen möglich	Gunaydin <i>et al.</i> , 2010; Berndt <i>et al.</i> , 2011; Prigge <i>et al.</i> , 2012 Yizhar <i>et al.</i> , 2011
SFO-Varianten: CrChR2-C128T/S/A -D156A/C/N	verlangsamer Photozyklus mit langlebigem leitenden Zustand, hohe Lichtsensitivität, schaltbar (Grün- bzw. UV-Licht)	Berndt <i>et al.</i> , 2009; Bamann <i>et al.</i> , 2010; Yizhar <i>et al.</i> , 2011; Wietek <i>et al.</i> , 2014; Dawydow <i>et al.</i> , 2014
CrChR2-T159C	große Kanalströme, höhere Bindungsaffinität zu Retinal	Berndt <i>et al.</i> , 2011 Ullrich <i>et al.</i> , 2013
CatCh (CrChR2-L132C) CatCh* (CatCh-T159C)	erhöhte Selektivität für Ca^{2+}	Kleinlogel, Feldbauer <i>et al.</i> , 2011 Prigge <i>et al.</i> , 2012
PsChR2 TsChR	aktivierbar mit UV-blauem Licht	Govorunova <i>et al.</i> , 2013 Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
Chronos	schneller Photozyklus	Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
C1V1(-E122T)	aktivierbar mit Orange (630 nm), gute Expression in tierischen Geweben, hoher 2P-Querschnitt	Yizhar <i>et al.</i> , 2011 Packer <i>et al.</i> , 2012; Prakash <i>et al.</i> , 2012
ReaChR	aktivierbar mit orange-rottem Licht (630 - 655 nm), gute Expression in tierischen Geweben und Fliegen, hoher 2P-Querschnitt	Lin <i>et al.</i> , 2013 Inagakai <i>et al.</i> , 2014 Chaigneau <i>et al.</i> , 2016
(Cs)Chrimson	aktivierbar mit rotem Licht (720 nm)	Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
ChloC (CrChR2-E90R-T159C) iC1C2	designte anionenleitende ChRs	Wietek <i>et al.</i> , 2014 Berndt <i>et al.</i> , 2014
GtACR1/2 PsACR1	natürliche Anionenkanäle, größere Ströme als designte Varianten	Govorunova <i>et al.</i> , 2015 Wietek <i>et al.</i> , 2016

Die Integration zweier ChRs mit deutlich voneinander getrennten Absorptionsmaxima, am besten blau- und rot-absorbierend, in unterschiedliche neuronale Gewebe, ermöglicht die individuelle Aktivierung einzelner Populationen in Abhängigkeit der Lichtfarbe. Die so genannte Zwei-Farben- oder kombinatorische Optogenetik wurde bereits erfolgreich in Neuronen und in lebendigen Mäusen mit C1V1-E123T-E162T (C1V1-ET/ET) ($\lambda_{\max} = 535$ nm) und CrChR2-H134R ($\lambda_{\max} = 460$ nm) (Yizhar *et al.* 2011) bzw. in Mäusegehirnschnitten mit Chronos ($\lambda_{\max} = 490$ nm) und CsChrimson (Klapoetke *et al.* 2014) und in *C. elegans* mit CrChR2 ($\lambda_{\max} = 470$ nm) und C1V1-ET/ET (Erbguth *et al.* 2012) bzw. CoChR und CsChrimson (Schild & Glauser 2015) realisiert. Da alle rot-verschobenen ChRs eine residuale Absorption im blauen Spektralbereich aufweisen, kann es bei Aktivierung der blau-absorbierenden Varianten auch zu einer Anregung des roten ChRs kommen (engl. *crosstalk*). Um die gegenseitige Beeinflussung

möglichst gering zu halten, bedarf es einer genauen Justierung der Aktivierungswellenlänge und dessen Intensität. Die Verwendung von T_3 ChR bzw. P_3 ChR2 ($\lambda_{\text{max}} = 430 - 440 \text{ nm}$) in Kombination mit CsChrimson ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$) könnte das Ausmaß an Mischanregung weiter reduzieren. Tabelle 7 fasst einige wichtige und viel benutzte Varianten und deren Vorteile im Rahmen von neurophysiologischen Experimenten zusammen.

1.4 Expression von mikrobiellen Rhodopsinen

Erste funktionelle Untersuchungen von ChRs in einem heterologen System wurden in *Xenopus laevis*-Oozyten (Eizellen des afrikanischen Krallenfroschs) und immortalisierten Nierenzellen von Säugetieren (HEK293, engl. *human embryonic kidney* & BHK, engl. *baby hamster kidney*) durchgeführt (Nagel *et al.* 2002; Nagel *et al.* 2003). Zahlreiche Mutagenesestudien lieferten ChR-Mutanten mit verbessertem Expressionsgrad (Stehfest & Hegemann 2010; Berndt *et al.* 2011) oder höherer Affinität für Retinal (Ullrich *et al.* 2013), aber besonders der Austausch des N-Terminus und einzelner Helices mit denen anderer ChRs generierte Chimären mit vorteilhaften Eigenschaften gegenüber den parental Konstrukten (Lin *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Tsunoda & Hegemann 2009; Yizhar *et al.* 2011; Prigge *et al.* 2012). Trotz der verbesserten Expression in Zellkultursystemen dienten diese aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften eher der elektrophysiologischen Charakterisierung der zugrunde liegenden Photorezeptoren als der Produktion großer Mengen von rekombinantem Protein für spektroskopische Experimente.

Dem letztgenannten Anspruch konnte mit der Verwendung adhätierender COS-1-Zellen (Nierenfibroblasten der afrikanischen grünen Meerkatze) für V_1 ChR1, V_1 ChR2, V1V2-25, C_1 ChR1 und C_1 ChR2 genüge getragen werden (Berthold *et al.* 2008; Ernst *et al.* 2008; Ritter *et al.* 2008; Kianianmomeni *et al.* 2009). Die Mengen der rekombinanten ChRs genügten bei gut exprimierenden ChRs wie C_1 ChR2 für die Durchführung von spektroskopischen Messungen (UV-vis & FTIR). Obwohl die Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie (1D4-Antikörper) sehr hohe Reinheiten lieferte, leidet die Expression in COS-1-Zellen aufgrund der benötigten Infrastruktur und hochpreisigen Reagenzien an hohen Kosten.

Als kostengünstigste und schnellste Methode stand die Expression aus *Escherichia coli* bereits lange im Fokus vieler Arbeitsgruppen. Zu Beginn der Arbeit wurden bereits einige mikrobielle Rhodopsine aus *E. coli* funktionell exprimiert. Dazu zählen BR aus *Halobacterium salinarum* (Hohenfeld *et al.* 1999), HR aus *Natronomonas pharaonis* (Hohenfeld *et al.* 1999), SRI aus *H. salinarum* (Schmies *et al.* 2000) und *Salinibacter ruber* (Sr SRI) (Kitajima-Ihara *et al.* 2008; Sudo *et al.* 2011), SRII aus *N. pharaonis* (Np SRII) (Shimono *et al.* 1997; Hohenfeld *et al.* 1999) und aus *H. salinarum* (Mironova *et al.* 2005; Dai *et al.* 2010) sowie aus *Anabaena* sp. PCC7120 (ASR) (Jung *et al.* 2003). Zusätzlich konnten zwei marine (Grünes und Blaues PR) (Béjà *et al.* 2000; Béjà *et al.* 2001), ein weiteres archaelles (Archærhodopsin-3) aus *Halorubrum sodomense* (Sineshchekov *et al.* 2012) sowie eine eubakterielle Protonenpumpe aus *Gloeobacter violaceus* (Miranda *et al.* 2009) in *E. coli* exprimiert werden. Im Rahmen von spektroskopischen Experimenten wurden keine

Unterschiede zwischen isoliertem Protein aus seinem nativen Wirt und heterolog exprimiertem Protein festgestellt. Infolgedessen wurde eine funktionelle Proteinfaltung in die fremde *E. coli*-Membran angenommen (Shimono *et al.* 1997; Hohenfeld *et al.* 1999; Schmies *et al.* 2000).

Für NpSR11 war die Proteinqualität des aus *E. coli* exprimierten Proteins sogar suffizient für die kristallographische Strukturaufklärung (Royant *et al.* 2001; Gushchin *et al.* 2011). Bereits nach Beginn der hiesigen Arbeit wurde auch von der funktionellen Expression einer Na⁺-Pumpe aus *Krokinobacter eikastus* aus *E. coli* (Inoue *et al.* 2013) und nachfolgender Kristallisation berichtet (Kato, Inoue *et al.* 2015; Gushchin *et al.* 2015). Trotz einer ähnlichen globalen Struktur mit sieben transmembranen Helices und erheblicher Anstrengungen gab es zu Beginn der Arbeit keine Belege für die funktionelle Expression von ChRs aus *E. coli* (Kateriya 2004; Berthold *et al.* 2008). Da rekombinante ChRs zumindest teilweise glykosyliert (Ernst *et al.* 2008; Bruun 2013) und phosphoryliert (Wagner *et al.* 2007) vorliegen, wurde zumeist das Ausbleiben von post-translationalen Modifikationen (PTMs) in niederen Prokaryoten als Hauptgrund für die nicht erfolgreiche Expression angeführt. PTMs spielen in Rhodopsinen nicht nur für die Signaltransduktion, sondern auch für die Proteinfaltung, -sekretion sowie -transport eine entscheidende Rolle (Kaushal *et al.* 1994; Tam & Moritz 2009).

In 2014 wurde von der expressionssteigernden Wirkung des Auxiliäres Mistic (engl. *membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs*) für die Expression von BR in *Escherichia coli* berichtet (Kahaki *et al.* 2014). Mistic ist ein 110 AS großes α -helikales Membranprotein aus *Bacillus subtilis*, welches sich bei Expression in *E. coli* ohne Beteiligung der bakteriellen Proteinsekretionswege autonom in die Membran faltet (Roosild *et al.* 2005). Durch Fusionierung konnte neben BR auch die Expression des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals Kv1.1 aus *Aplysia*, einiger TGF- β -Rezeptoren, das Typ-3 GPCR GPRC5A, einige *E. coli*-Histidin-Kinase-Rezeptoren und der Cannabinoid-Rezeptor Subtyp 2 in *E. coli* erzielt werden (Roosild *et al.* 2005; Kefala *et al.* 2007; Chowdhury *et al.* 2012).

In 2007/2008 wurde ein Expressionssystem auf Basis der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* etabliert (Kirsch 2007; Bamann *et al.* 2008), welches PTMs ermöglicht. Obwohl seither einige Retinal-Proteine erfolgreich und in großen Ausbeuten in der Hefe exprimiert werden konnten (Nack *et al.* 2009; Bruun *et al.* 2011; Luck *et al.* 2012; Hou *et al.* 2012), wurden bis auf zwei kryo-elektronenmikroskopische Strukturen bei 6 Å (Müller *et al.* 2011; Müller *et al.* 2015) keine hochaufgelösten Röntgenstrukturen mit Probenmaterial aus *P. pastoris* gelöst.

In 2012 wurde dann die erste Kristallstruktur der Kanalrhodopsin-Chimäre C1C2 publiziert. Das Protein wurde in Insektenzellen (Sf+, *Spodoptera frugiperda*) exprimiert und die Kristallisation des aufgereinigten Proteins erfolgte in lipidischer Mesophase (engl. *lipid cubic phase*), was mithilfe der MAD-Methode (engl. *multi-wavelength anomalous dispersion*) eine Auflösung von 2.3 Å ermöglichte (Kato *et al.* 2012). Da die Expression, Aufreinigung und letztendlich die Kristallisation von Volllängenprotein aufgrund des amphipathischen Charakters (hydrophober Membranteil *vs.* hydrophiler C-Terminus) und der hohen Flexibilität der löslichen Domänen erschwert wird, wurden große Teile des C-Terminus in dem Hybrid abgeschnitten. Anscheinend brachte die Konstruktion einer chimären Variante und die nachfolgende Expression in

Insektenzellen entscheidende Vorteile in Hinsicht auf Stabilität und Monodispersität der Probe gegenüber den parental Proteinen sowie anderen Expressionssystemen.

1.5 N-Glykosylierung für die Expression in *Escherichia coli*

N-Glykosylierung stellt in Eukaryoten die am häufigsten auftretende Proteinmodifikation dar. Dabei wird das zu glykosylierende Protein während der Translation (co-translational) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von einer Oligosaccharyltransferase mit einer verzweigten Kohlenhydratkette (Glc₃Man₉GlcNAc₂; Glc, Glucose; Man, Mannose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin) beladen (Kornfeld & Kornfeld 1985). Lange glaubte man, dass solch ein Glykosylierungssystem der Domäne der Eukaryoten vorbehalten sei, doch im Jahr 1999 wurde im Genom des Eubakteriums *Campylobacter jejuni* ein Gencluster (*pgl*, engl. *protein glycosylation*) identifiziert, welcher in die N-Glykosylierung von mindestens 22 Proteinen, u.a. Flagellin und auch integrale Membranproteine, involviert ist (Szymanski *et al.* 1999; Young *et al.* 2002; Kowarik, Young *et al.* 2006). Die zugrunde liegende Reaktionskaskade zeigt Ähnlichkeiten zum eukaryotischen Pendant. Dabei wird im Cytoplasma an einem Lipidanker durch eine Reihe von Glykosyltransferasen sukzessive ein Heptasaccharid (GalNAc₅GlcBac; GalNAc, N-Acetylgalactosamin; Bac, Bacillosamin) aufgebaut (Abbildung 17) (Young *et al.* 2002). Im Anschluss wird der Flipflop des Glykans über die Membran durch den Transporter PglK katalysiert und das exprimierte Protein durch die Oligosaccharyltransferase PglB mit der Kohlenhydratkette beladen. Die kovalente Bindung wird dabei spezifisch an Asparaginreste innerhalb des Konsensus N-X-S/T (X ≠ P) geknüpft. Im Gegensatz zu Eukaryoten findet die Glykosylierung in *C. jejuni* erst nach der Translation statt.

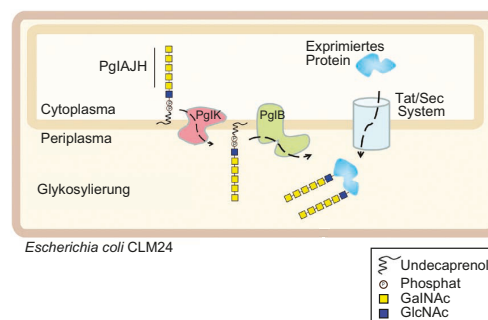


Abbildung 17: N-Glykosylierung in *Escherichia coli*. Koexpression der Glykosylierungskassette aus *Campylobacter jejuni* (*Pgl*) ermöglicht die post-translationale N-Glykosylierung von rekombinanten Proteinen in *E. coli*. Gewünschte Proteine werden translatiert und über das Sec-Translocon bzw. den Twin-Arginin-Transport (Tat) über die Cytoplasmamembran befördert. Die Glykosyltransferasen (*PglA/H-J*) bilden ein Oligosaccharid an einem Lipidanker im Cytoplasma und die Floppase (ABC-Transporter) *PglK* katalysiert den Transport in den periplasmatischen Raum, in welchem die Oligosaccharyltransferase *PglB* die Zuckerkette an zugängliche Asparagine des exprimierten Proteins knüpft. Abbildung ist entnommen und modifiziert aus Schwarz *et al.* (2010) mit Erlaubnis von Nature Publishing Group (London, Großbritannien).

Wacker *et al.* transferierten das System nach *E. coli* und konnten erstmals die erfolgreiche Glykosylierung zweier im Wirt heterolog exprimierter periplasmatischer Proteine AcrA und PEB3 aus *C. jejuni* nachweisen (Wacker *et al.* 2002). Weitere Studien beinhalteten Rinder-Ribonuklease A (Kowarik, Numao *et al.* 2006), einem Maus-Antikörperfragment (Lizak *et al.* 2011) sowie die β -Fass-bildenden Membranproteine OmpX aus *E. coli* sowie OmpH1 aus *C. jejuni* (Fisher *et al.* 2011).

1.6 Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren

1.6.1 Inkorporationsmethoden

Seit dem frühen Beginn der Biowissenschaften war es stets ein Anliegen vieler Wissenschaftler die einzelnen Banden der Schwingungsspektren in den teils hochkomplexen Proteinspektren konkreten Aminosäuren zuzuordnen. Aufgrund der Vielzahl derselben funktionellen Gruppen kommt es jedoch häufig zu Überlagerungsphänomenen, welche die Interpretation erheblich erschweren. Infolgedessen wurde sich auf die weniger abundanten funktionellen Gruppen konzentriert. Im Falle der Schwingungsspektroskopie sind das z.B. protonierte Aminosäureseitenketten von Asparagin- und Glutaminsäure sowie Thiole von Cysteinresten. Obwohl die korrespondierenden Banden in einem hochfrequenten Spektralbereich ($> 1700 \text{ cm}^{-1}$) absorbieren und die Anzahl der Reste gegenüber der ubiquitären Amidbindung des Proteinrückgrats deutlich reduziert ist, ist die Zuordnung dennoch nicht trivial. Unter der Annahme einer konservierten Funktion kann eine breitangelegte Mutagenesestudie der relevanten Reste Abhilfe verschaffen. Ein eleganterer und auch weniger invasiver Ansatz bedient sich der Inkorporation von schweren Isotopen, welche infolge des größeren Trägheitsmoments eine Verschiebung der korrespondierenden Bande(n) verursachen.

Da viele Proteine keinen Cofaktor mit einem ungepaarten Elektron, z.B. Eisen-Schwefel-Cluster, und damit auch kein permanentes magnetisches Moment besitzen, können sie in ihrer nativen Form *via* ESR-Spektroskopie nicht untersucht werden. Um sie dennoch mithilfe dieser Methode charakterisieren zu können, z.B. Abstände zu messen, müssen die Proben mit einem Spin-Label markiert werden.

Im folgenden Kapitel sollen verschiedene Methoden zum Einbau von nichtkanonischen Aminosäuren in Zielproteine für spektroskopische Anwendungen vorgestellt werden. Neben der Integration von schweren Isotopen ruht der Hauptfokus auf der Integration von nichtproteinogenen Funktionalitäten wie N_3 , CN, F und NO. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren je nach Auffassung vier bis fünf Technologien (Abbildung 18).

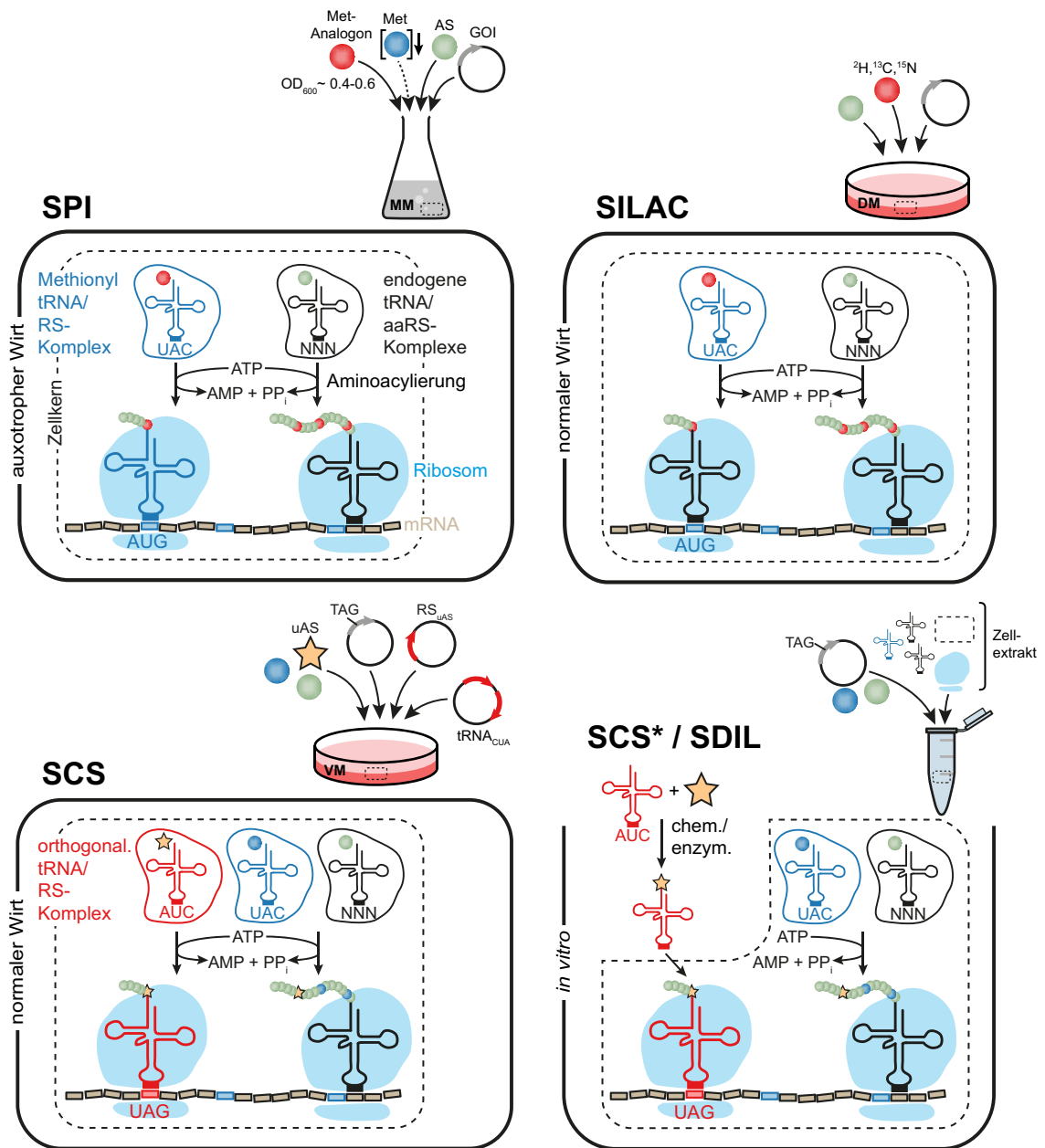


Abbildung 18: Methoden zur Einführung von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine. Supplementationseinbau (SPI) am Beispiel eines methioninauxotrophen Stamms. Ein isosterisches Methionin-Analogon wird global (als Folge eines jeden AUG-Codons) ins Protein eingebaut. Der Wirt wird in Minimalmedium (MM) mit einer limitierenden Konzentration von Methionin kultiviert und erst nach vollständiger Verstoffwechselung des Methionins in der mid-logarithmischen Phase mit dem Analogon versetzt (zeitgleich mit Induktion der Expression des Zielproteins). Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) demonstriert für den Einbau eines schweren Methionin-Isotops. Die Säugerzellen werden in definiertem Medium (DM, ohne leichtes [1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S]-Methionin) inkl. dem zu inkorporierenden schweren Isotop (hier z.B. [$^{13}CD_3$]-Methionin, cf. Abbildung 19, 27) kultiviert. Das schwere Analogon wird global inkorporiert. Stopp-Codon-Suppression (SCS) erlaubt die ortsspezifische Integration einer unnatürlichen Aminosäure (uAS) als Folge eines Amber-Stopp-Codons (TAG) im Zielgen. Der Wirt wird in Vollmedium (VM) in Anwesenheit der uAS kultiviert und mit (zwei bis) drei Plasmiden transfiziert (bzw. transformiert oder transduziert, je nach Expressionssystem & Methode). Die designte Aminoacyl-tRNA-Synthetase (RS_{uAS}) belädt die Suppressor-tRNA_{CUA} mit der uAS. Das modifizierte Anticodon (CUA) der tRNA_{CUA} bindet an das Stopp-Codon auf der mRNA und verhindert die Translationstermination, d.h. Bindung eines Freisetzungsfaktors. SCS* und Ortsgerichtete Isotopenmarkierung (SDIL) beschreiben *in vitro*-Varianten der SCS ohne zelluläre Aminoacylierung der Suppressor-tRNA. Die tRNA_{CUA} wird entweder chemisch oder enzymatisch mit der uAS beladen. Die Translation bzw. der Einbau der uAS erfolgt in zellfreien Systemen.

Supplementationseinbau

Der bereits seit mehreren Dekaden praktizierte Supplementationseinbau (SPI, engl. *selective pressure incorporation* bzw. *supplementation-based incorporation*) erlaubt die globale Substitution einer kanonischen Aminosäure gegen ein nichtkanonisches Analogon im Zielprotein (sowie dem gesamten Wirtsproteom). Damit die zelluläre Translationsmaschinerie, vor allem die relevante Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die artifizielle Aminosäure erkennt und erfolgreich inkorporiert, muss sie ihrem natürlichen Pendant in Hinsicht auf Sterik und physikochemischen Eigenschaften entsprechen. So können zum Beispiel schwere Isotope von Aminosäuren (Abbildung 19, **30** & **31**) oder isosterische Reste (Methionin *vs.* Homoazidoalanin) (Abbildung 19, **2**) verwendet werden.

Um eine hohe spezifische Inkorporationsrate der unnatürlichen Aminosäure zu gewährleisten, sind entsprechende mikrobiologische und experimentelle Begebenheiten gefordert. Zum einen wird ein auxotropher Wirt verwendet, welcher nicht in der Lage ist, den auszutauschenden Rest selbstständig zu synthetisieren. Letzterer wird meist durch Gendelektionen im Biosyntheseweg der entsprechenden Aminosäure *via* Rekombination generiert (Mehlhorn *et al.* 2013). Zum anderen wird dieser Wirt in einem Minimalmedium kultiviert, welchem nur limitierende Dosen der korrespondierenden Aminosäure zugesetzt werden. Nach quantitativer Metabolisierung des nativen Substrats wird die Expression des Zielproteins induziert und das nichtkanonische Pendant zum Nährmedium hinzugefügt. Im Optimalfall hat das resultierende Translationsprodukt (Kongener) ausschließlich das artifizielle Analogon eingebaut.

Da die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) nur die Aminoacylierung von strukturell ähnlichen Substraten katalysiert, wurde eine Mutantenbibliothek von MetRS aus *E. coli* generiert, um die Permissivität gegenüber räumlich anspruchsvolleren Aminosäuren zu vergrößern (Link *et al.* 2006). Innerhalb des Screens konnte eine Mutante isoliert werden, welche das artifizielle Azidonorleucin (Abbildung 19, **2**) spezifisch auf die native Methionyl-tRNA_{CAU} (Subskript beschreibt Anticodon-Sequenz) transferiert. Bei Koexpression der modifizierten MetRS unter SPI-Bedingungen wird die nichtkanonische Aminosäure anstelle von Methionin ins Zielprotein inkorporiert (Ngo *et al.* 2009; Tanrikulu *et al.* 2009). Zusätzlich war kein auxotropher Stamm nötig.

Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur

In ähnlicher Weise zur SPI funktioniert SILAC (engl. *stable isotopic labeling of amino acids in cell culture*). Die zumeist für die Inkorporation von Isotopen verwendete Methode ermöglicht die globale Substitution einer Aminosäure, häufig Leucin, Methionin, Arginin oder Lysin (Abbildung 19, **32** - **36**), gegen ein schweres Pendant. Letztgenanntes wird anstelle des leichten Isotops dem definierten Nährmedium zugesetzt. Die Anwendung ist aber nicht nur auf Isotope beschränkt. Azidohomoalanin lässt sich ebenfalls global als Methionin-Analogon in Proteine einbauen, welche nur in höheren Eukaryoten exprimiert werden können (Dieterich *et al.* 2006; Dieterich *et al.* 2007). Im Gegensatz zur SPI erfordert SILAC keinen auxotrophen Stamm und so erstreckt sich das Wirtsspektrum auf eine Vielzahl von tierischen Säugerzellen (Tabelle 8).

Stopp-Codon-Suppression

Da beide vorhergenannten Technologien nur eine globale Substitution ermöglichen, ist die Anwendung auf Aminosäuren limitiert, welche in einer geringen Anzahl, am besten nur einmal im Protein der Wahl auftreten. Ansonsten könnte sich die Interpretation der von mehreren markierten Resten herrührenden Änderungen ebenfalls als schwierig erweisen. Eine Methode, welche sich dieser Diskussion obsolet macht, ist die SCS (engl. *stop codon suppression*). SCS bedient sich der Reprogrammierung eines ansonsten für die Translationstermination verantwortlichen Stopp-Codons auf der mRNA. Während im natürlichen Fall ein Freisetzungsfaktor an das Stopp-Codon bindet und den Translationsprozess terminiert, wird dies bei der SCS durch Bindung einer modifizierten tRNA supprimiert. Je nachdem, welches der drei möglichen Stopp-Codons (Amber (UAG), Opal (UGA) oder Ochre (UAA)) recodiert werden soll, wird das komplementäre Anticodon auf der Suppressor-tRNA modifiziert. Da in Pro- und Eukaryoten das Amber-Codon am seltensten vertreten ist (*E. coli*: 7 %, *H. sapiens*: 23 %) (Liu *et al.* 2007), stützen sich die meisten Anwendungen auf das UAG-Codon. Jedoch existieren auch Berichte über die erfolgreiche Definition der Opal- und Ochre-Codons in „Sinn-Codons“ (Köhler *et al.* 2004). Durch konventionelle Mutagenese lässt sich eines der Stopp-Codons ortsspezifisch im Protein der Wahl platzieren.

Um die Suppressor-tRNA spezifisch mit einer Aminosäure der Wahl zu beladen, bedarf es einer entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS). Die beiden Komponenten sollten nur miteinander interagieren und keine Kreuzreaktivität gegenüber endogenen aaRS/tRNA-Paaren demonstrieren, d.h. orthogonal sein. In den meisten Fällen wird dies durch Verwendung von wirtsfremden Bestandteilen realisiert, was allerdings im Gegenzug das Wirtsspektrum begrenzen kann. So ist das Tyrosyl-RS/tRNA_{CUA}-Paar aus dem Archaeon *Methanococcus jannaschii* zwar in *E. coli* orthogonal (Wang *et al.* 2000), aber nicht in höheren Eukaryoten. Im Umkehrschluss funktionieren orthogonale Paare aus Prokaryoten wie z.B. *E. coli* und *Bacillus stearothermophilus* gut in *S. cerevisiae* (Chin *et al.* 2003; Lee *et al.* 2009), CHO (Sakamoto *et al.* 2002) und HEK293(T) (Ye *et al.* 2008; Ye *et al.* 2009; Shen *et al.* 2011), aber nicht in den Spenderorganismen und anderen Prokaryoten. Eine Ausnahme stellt das Pyrrolysyl-RS/tRNA_{CUA}-Paar aus den methanogenen Archaeen *Methanosarcina barkeri* und *M. mazei* dar, welches neben *E. coli* (Blight *et al.* 2004; Neumann *et al.* 2008) auch in *S. cerevisiae* (Hancock *et al.* 2010) und tierischen Säugerzellen (Chen *et al.* 2009) orthogonal ist. Das Anwendungsspektrum umfasst auch Organismen wie *C. elegans* (Fadenwurm, Nematoda) (Greiss & Chin 2011), *D. melanogaster* (Taufliege) (Bianco *et al.* 2012), *A. thaliana* (Acker-Schmalwand) (Li *et al.* 2013), *Mus musculus* (Hausmaus) und *Danio rerio* (Zebrafisch) (Chen *et al.* 2017). Da für den Einbau der 22ten Aminosäure (Pyrrolysin, Pyl) in den Archaeen nativ ein Amber-Codon von der Pyl-tRNA supprimiert wird, ist eine genetische Modifikation des Anticodons nicht notwendig.

Im Allgemeinen ist die SCS relativ ineffizient und es wird nur eine Suppressionseffizienz je nach Position von 10 - 70 % erreicht (Ye *et al.* 2009). Dies liegt primär daran, dass die Suppressor-tRNA mit dem bzw. den Freisetzungsfaktor(en) um das Stopp-Codon konkurrieren muss, und es also nicht immer zu der Expression eines Volllängenproteins kommt. Durch Mutationen bzw. Knockout der entsprechenden Terminationsfaktoren (Mukai, Hayashi *et al.*

2010; Johnson *et al.* 2011; Wu *et al.* 2013; Lajoie *et al.* 2013; Schmied *et al.* 2014) sowie durch Koexpression eines orthogonalen Ribosoms (ribo-X) (Wang *et al.* 2007) konnte das erfolgreiche Überlesen der Stopp-Codons deutlich verbessert werden. Zusätzlich gewährleisteten diese Modifikationen die Einführung von mehreren unnatürlicher Aminosäuren (bis zu 22) innerhalb eines Zielproteins.

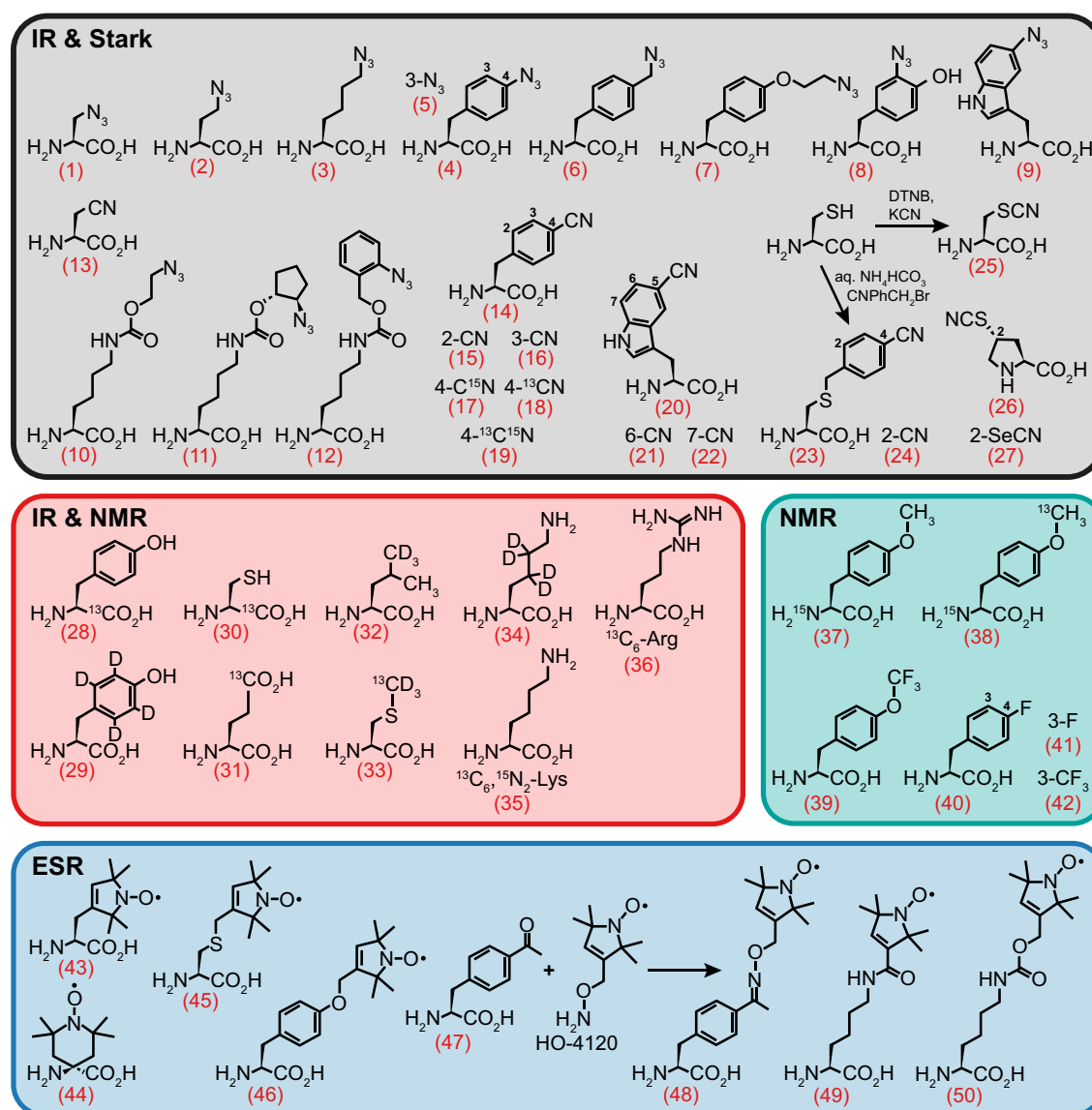


Abbildung 19: Übersicht einiger unnatürlicher Aminosäuren für spektroskopische Anwendungen. Artifizielle Aminosäuren wurden entsprechend ihrer Anwendungsmöglichkeiten gruppiert (*farbig unterlegt*). Stark, Stark-Spektroskopie; DNTB, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure bzw. Ellman's Reagenz; Individuelle Inkorporationsmethode siehe Tabelle 8.

Via ortsgerichteter Mutagenese der Aminosäurebindestelle von aaRS's konnte das Substratspektrum deutlich über die 22 natürlichen Bausteine expandiert werden. Bis dato ist die Integration von mehr als 167 nichtkanonischen Aminosäuren in diverse Proteine und

Organismen beschrieben (Dumas *et al.* 2015). Als Template dienten zumeist Leucyl- (Lee *et al.* 2009; Shen *et al.* 2011), Tyrosyl- (Chin *et al.* 2003), Tryptophyl- (Italia, Addy *et al.* 2017) und Pyrrolysyl-RS (Yanagisawa *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2009), welche aufgrund ihrer Permissivität und Größe der Bindetasche gut geeignet sind. Die Möglichkeit eine sehr breite Auswahl von nichtkanonischen Aminosäuren ortsspezifisch in beliebige Protein zu inkorporieren, machte die SCS zur Methode der Wahl.

Ortsgerichtete Isotopenmarkierung

Varianten der SCS stellen SCS* und SDIL (engl. *site-directed isotopic labeling*) dar. Im Gegensatz zur zellulären SCS erfolgt die Beladung der Suppressor-tRNA_{CUA} sowie die Proteinbiosynthese *in-vitro*. Nach chemischer oder enzymatischer Aminoacylierung wird die tRNA_{CUA} zu dem entsprechenden Zellextrakt inkl. Ziel-DNA hinzugefügt. Mit dieser Technologie wurden ortsspezifisch schwere Tyrosin-Isotope (Abbildung 19, **28 - 29**) an mehreren Positionen in BR eingeführt (Sonar *et al.* 1994; Sonar *et al.* 1995; Ludlam *et al.* 1995).

1.6.2 Spektroskopie mithilfe unnatürlicher Aminosäuren

Abbildung 19 gibt einen Überblick über spektroskopisch relevante Reportergruppen, welche entweder direkt über eine der vorgestellten Methoden oder/und mittels anschließender Derivatisierung (*cf.* Tabelle 8) innerhalb eines Proteins platziert werden konnten. Ein Großteil der präsentierten Aminosäuren tragen entsprechend ihres Einsatzgebiets nichtproteinogene Azido- (N₃), Cyano- (CN), Thiocyanato- (SCN), Fluorid- oder Nitroxid-Gruppen (NO).

Für schwingungsspektroskopische Anwendungen sind die N₃-, CN- und SCN-Funktionalitäten von Vorteil, da deren Oszillationen in einem spektralen Fenster > 1800 cm⁻¹ beobachtet werden und damit weit von intrinsischen Proteinvibrationen separiert sind. Bei Änderungen der Polarität und des elektrischen Felds in der Markerumgebung verschiebt sich die spektrale Lage der Absorptionsbande (engl. *vibrational Stark effect* bzw. Solvato- oder Elektrochromismus). Der ortsspezifische Einbau ermöglicht so die simultane Detektion der Proteindynamiken sowie Hydratisierungsänderungen des Labels und des übrigen Proteins *via* konventioneller FTIR-Methoden. Im Rahmen der Stark-Spektroskopie (Messungen in An- und Abwesenheit eines definierten externen elektrischen Felds) lassen sich die wirkenden elektrischen Felder quantifizieren und deren Änderungen als Folge eines Stimulus beobachten. Das Spektrum der IR-Reporter reicht von kleinen aliphatischen bis hin zu großen aromatischen Molekülen, von denen bereits einige (**2, 4, 6, 7, 14, 17 - 19, 23 & 25**) in schwingungsspektroskopischen Experimenten an rekombinanten Proteinen verwendet wurden (Schultz *et al.* 2006; Fafarman *et al.* 2006; Ye *et al.* 2009; Taskent-Sezgin *et al.* 2010; Thielges *et al.* 2011; Bloem *et al.* 2012; Bazewicz *et al.* 2012; Bazewicz *et al.* 2013; Tookmanian *et al.* 2015).

Die Absorption von N₃-Gruppen ist von der Polarität und speziell von der Verfügbarkeit von (starken) Protonendonoren abhängig. Dabei induziert eine Zunahme der Polarität die Verschiebung zu größeren und eine Abnahme der Polarität zu kleineren Wellenzahlen (Oh *et al.*

2008; Ye *et al.* 2009; Bazewicz *et al.* 2013). Freies azF absorbiert in Isopropanol (Dielektrizitätskonstante, $\epsilon_r = 19.9$) bei $\nu_{\max} = 2115.5 \text{ cm}^{-1}$ und in Wasser ($\epsilon_r = 78.4$) bei $\nu_{\max} = 2128.6 \text{ cm}^{-1}$ (Ye *et al.* 2009). Diese Verschiebung gründet primär auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken der freien Elektronenpaare der Stickstoffe mit dem entsprechenden H^+ -Donor des protischen Solvenz (Wolfshorndl *et al.* 2012; Kim & Cho 2013), infolgedessen die Bindungslänge der N_3 -Gruppe abnimmt und die Kraftkonstante zunimmt (Oh *et al.* 2008). Die Verschiebung scheint dabei weniger von der Polarität des Lösungsmittels, als von der Fähigkeit des Solvens H-Brücken auszubilden, abzuhängen. So absorbiert azF in dem im Vergleich zu Isopropanol polarerer Dimethylsulfoxid (DMSO, $\epsilon_r = 46.7$) dennoch maximal bei der gleichen Wellenzahl ($\nu_{\max} = 2115.5 \text{ cm}^{-1}$) (Bazewicz *et al.* 2013). Selbst der Theorie nach stärkere H^+ -Donoren wie Formamid oder Trifluorethanol ($\Delta\nu_{\max} \sim 5 - 6 \text{ cm}^{-1}$) vermögen nicht die gleiche Blauverschiebung wie H_2O zu bewirken. Daher scheint die Solvatochromie von azF primär von der Präsenz von Wasser abzuhängen (Wolfshorndl *et al.* 2012).

Azidomutanten inklusive **2**, **3**, **4** oder **11** konnten mittels bio-orthogonaler Kopplungsreaktionen an diverse andere Gruppen wie Epitope, Biotin und Fluorophore gebunden werden (Link & Tirrell 2003; Dieterich *et al.* 2006; Ngo *et al.* 2009; Tanrikulu *et al.* 2009; Hao *et al.* 2011; Naganathan *et al.* 2013; Tian *et al.* 2013; H. Tian *et al.* 2014). **4** wurde ebenfalls als potenter Photocrosslinker für Dimerschnittstellen oder Liganden eingesetzt (Chin *et al.* 2002; Grunbeck *et al.* 2012; Coin *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2014). Drei der gezeigten Reportergruppen (**23** - **25**) wurden erst nach der Proteinexpression durch Cystein-Cyanilierung oder -Alkylierung generiert.

Manche schwere Isotope (Kernspin, $I \neq 0$) eignen sich nicht nur für die nichtinvasive Bandenzuordnung in IR-Messungen, sondern auch für Strukturaufklärung *via* NMR. Mittels SCS konnten einige NMR-aktive Aminosäuren (**37** - **42**) erfolgreich in bestimmte Proteine integriert werden (Furter 1998; Deiters *et al.* 2005; Cellitti *et al.* 2008; Wang *et al.* 2013). Besonders fluoriierte Reste sind für die NMR-Spektroskopie interessant, da ^{19}F ($I = 1/2$) monoisotopisch ist und nach ^1H das zweitgrößte gyromagnetische Verhältnis aufweist.

Wie bereits erwähnt lassen sich nur Proben mittels ESR-Spektroskopie charakterisieren, welche mindestens ein stabiles Radikal aufweisen. Wenn nicht bereits nativ vorhanden, wird ein ungepaartes Elektron nach Cystein-Mutagenese über eine anschließende Markierungsreaktion mit MTS(S)L (*S*-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methylmethansulfon-thioat) ins Protein inkorporiert. Da die Kopplungsreaktion häufig auf exponierte Proteinregionen limitiert ist, wurde versucht mittels verschiedener Methoden einen entsprechenden Spin-Marker genetisch zu kodieren. Während frühe Ansätze sich der chemischen bzw. enzymatischen Acylierung einer Suppressor-tRNA mit Nitroxid-Aminosäuren bedienten (Cornish *et al.* 1994; Shafer *et al.* 2004), konnten in jüngster Zeit auch orthogonale Paare für zwei Pyrrolysin-basierte Spin-Marker (**49** & **50**) erzeugt werden (Schmidt *et al.* 2014). Alternativ ermöglicht die SCS die ortsspezifische Inkorporation von artifiziellen Keton-Aminosäuren, welche in einer Folgereaktion mit einem radikalischen Hydroxylamin-Derivat des

tetramethylierten Oxypyrrols (HO-4120) zu einem Ketoxim (48) kondensiert werden können (Fleissner *et al.* 2009; Hahn *et al.* 2014).

Tabelle 8: Inkorporationsmethoden der illustrierten unnatürlichen Aminosäuren. uAS aus Abbildung 19 sind entsprechend ihrer spektroskopischen Anwendungsmöglichkeiten farbig unterlegt: IR- und Stark- (*grau*), IR- und NMR- (*rot*), NMR- (*türkis*) und ESR-Spektroskopie (*blau*). Erfolgreicher Einbau mancher uAS in bestimmten Expressionssystemen wurde nicht explizit demonstriert (*in Klammern*), allerdings ist das verwendete Pyrrolsyl-RS/tRNA_{CUA}-Paar orthogonal in Hefen und Säugerzellen (Liu & Schultz 2010). SPI*, SPI bei Koexpression einer Mutante der Methionyl-tRNA-Synthetase, welche nur das Analogon Azidonorleucin (*cf.* Abbildung 19, 3) erkennt. HeLa, menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks.

uAS	Inkorporation/ Derivatisierung	Expressionssystem	Referenz
1	synthetisch	synthetisch	Kiick et al., 2002; Oh et al., 2008
2	SPI, SILAC	<i>E. coli</i> , HEK293, Neuronen	Kiick et al., 2002; Link & Tirelli, 2003; Dieterich et al., 2006, 2007; Taskent-Sezgin et al., 2010
3	(Met-Analogon)	<i>E. coli</i>	Link et al., 2006; Ngo et al., 2009; Tanrikulu et al., 2009
4	SPI* (Met-Analogon)	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i> , CHO, HEK293(T), <i>D. melanogaster</i>	Chin et al., 2002, 2003; Deiters et al., 2003; Liu et al., 2007; Young et al., 2009; Ye et al., 2009, 2010; Mukai, Wakiyama et al., 2010
5	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Wang et al., 2013
6	SCS	<i>E. coli</i>	Bazewicz et al., 2013
7	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Tookmanian et al., 2014, Tuley et al., 2014
8	SCS	<i>E. coli</i>	Iraha et al., 2010
9	-	-	Italia, Zheng et al., 2017
10	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Nguyen et al., 2009
11	SCS	<i>E. coli</i> , HEK293T, (Hefen etc.)	Hao et al., 2011
12	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Yanagisawa et al., 2008.
13	synthetisch	synthetisch	Getahun et al., 2003; Oh et al., 2008
14	synthetisch, SCS	<i>E. coli</i>	Getahun et al., 2003; Schultz et al., 2006
15	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Tharp et al., 2014
16	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Liu & Schultz, 2010; Wang et al., 2013
17 - 19	SCS	<i>E. coli</i>	Bazewicz et al., 2012
20 - 22	SCS*, enzym. Acyl.	synthetisch, <i>in-vitro</i>	Waagele et al., 2009; Talukder et al., 2015
23 - 24	Alkylierung	<i>E. coli</i>	Jo et al., 2010
25	Cyanilierung	synthetisch, <i>E. coli</i>	Fafarman et al., 2006; Mohrmann et al., 2016
26 - 27	-	-	Park et al., 2013
28	SDIL	<i>E. coli</i>	Sonar et al., 1995; Ludlam et al., 1995
29	SDIL	<i>E. coli</i>	Sonar et al., 1994
30	SPI	<i>H. salinarum</i>	Hauser et al., 2002
31	SPI	<i>H. halobium</i>	Engelhard et al., 1985
32	SILAC	Myoblasten	Ong et al., 2002
33	SILAC	HeLa	Ong et al., 2004
34	SILAC	Fibroblasten	Gu et al., 2003
35	SILAC	HEK293	Park et al., 2006
36	SILAC	HEK293	Park et al., 2006
37	SCS	<i>E. coli</i>	Deiters et al., 2005
38 - 39	SCS	<i>E. coli</i>	Cellitti et al., 2008
40	SCS & SPI	<i>E. coli</i>	Furter et al., 1998
41 - 42	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Wang et al., 2013
43 - 44	SCS*	<i>in-vitro</i>	Cornish et al., 1994
45	SCS*, chem. Acyl.	<i>in vitro</i> , Oozyten	Cornish et al., 1994; Shafer et al., 2004
46	SCS*, chem. Acyl.	Oozyten	Shafer et al., 2004
47	SCS	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i> , CHO, HEK293T	Wang et al., 2003; Chin et al., 2003; Liu et al., 2007; Ye et al., 2008; Young et al., 2009
48	Ketoxim-Kopplung	<i>E. coli</i>	Fleissner et al., 2010; Hahn et al., 2014
49 - 50	SCS	<i>E. coli</i> , (Hefen, HEK293T etc.)	Schmidt et al., 2014

1.7 Zielsetzung

In 2013 wurde ein *V*ChR1-Derivat (ReaChR, engl. *red-activatable channelrhodopsin*) beschrieben, welches ein rhodopsinuntypisches (stationäres) Aktionsspektrum mit einem zu diesem Zeitpunkt unübertroffenen rot-verschobenen Maximum ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) aufwies. Mittels Rotlicht konnten tiefe Gehirnareale von wachen Mäusen, ohne die Entfernung bzw. operative Abtragung von Schädelsubstanz, aktiviert werden (Lin *et al.* 2013). Des Weiteren ermöglichte ReaChR Verhaltensstudien an Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) durch Anregung von Neuronen des Zentralen Nervensystems (Inagaki *et al.* 2014). Der hohe Zwei-Photonen-Querschnitt in ReaChR erlaubte die Tiefenstimulation von Gehirnschnitten und die Manipulation von transgenen Taufliegen mit IR-Licht ($\lambda = 1030 - 1250 \text{ nm}$) (Hsiao *et al.* 2015; Chaigneau *et al.* 2016). Außerdem wurde das rotlichtaktivierbare ChR erfolgreich für die Restaurierung der Sehkraft von blinden, an *Retinitis pigmentosa* leidenden Mäusen eingesetzt (Sengupta *et al.* 2016).

Obwohl ReaChR ein beliebtes optogenetisches Werkzeug darstellt, war zu Beginn der Arbeit wenig über die Photochemie und Protochromie von ReaChR und anderen rot-verschobenen ChRs bekannt. Ferner war die Ursache des ungewöhnlichen Aktionsspektrums in der Ursprungspublikation nicht geklärt. In Anbetracht dessen sollte ReaChR rekombinant hergestellt und mittels UV-vis- und FTIR-Spektroskopie charakterisiert werden. Neben der Aufklärung, der für die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums verantwortlichen molekularen Determinanten, bestand großes Interesse in der Untersuchung der unterschiedlichen pH-Abhängigkeiten in der ChR-Familie (*cf.* Tabelle 4). Zusätzlich stellte sich die Frage, inwiefern sich ReaChR mechanistisch von dem bis dato am besten untersuchten *CrChR2* unterscheidet. In diesem Kontext sollten Protontransferprozesse und sekundäre Photochemie von ReaChR näher analysiert werden.

Als weiterer Aspekt sollte die Kanalöffnung und -schließung in ChRs untersucht werden. Für diesen Zweck sollten IR-aktive, unnatürliche Aminosäuren als Reporter in die Photorezeptoren inkorporiert werden. Reste mit artifiziellen Funktionalitäten (CN, SCN & N₃) haben entscheidende Vorteile gegenüber natürlichen funktionellen Gruppen. Zum einen absorbieren sie in einem spektralen Fenster jenseits von endogenen Proteinschwingungen ($> 1800 \text{ cm}^{-1}$) und zum anderen sind sie sensitiv gegenüber lokalen Hydratisierungsänderungen. Für die Integration von solchen spektroskopischen Markern stehen, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, verschiedene Methoden zur Auswahl (*cf.* Abbildung 18). SPI und SILAC leisten die globale Substitution einer natürlichen Aminosäure gegen ein nichtkanonisches, isosterisches Pendant. Bei Verwendung von Methionin-Analoga wie z.B. Azidohomoalanin und Azidonorleucin (*cf.* Abbildung 19, **2** & **3**) würde es im Falle von ChRs, welche zwischen sieben (*DsChR*) und zwölf (ReaChR) Methioninen in der Rhodopsindomäne tragen, zu einer multiplen Markierung kommen. Die resultierenden Proteinspektren wären von komplexer Natur und nicht ohne Weiteres interpretierbar. Einer ähnlichen Problematik sieht man sich konfrontiert, wenn

man nach erfolgter Expression Cysteine *via* Ellman's Reagenz zu Thiocyanaten umfunktionalisieren würde (*cf.* Abbildung 19, **25**), da diese ebenfalls mehrfach in der Primärsequenz von ChRs (6 Cys in DsChR & 15 Cys in Chrimson) auftreten. Bei der Cystein-Cyanilierung käme erschwerend dazu, dass die chemische Reaktion nur an gut zugänglichen Positionen des Proteins möglich wäre. Studien an räumlich beengten Regionen, wie z.B. in der Kanalpore von ChRs, wären mit dieser Methode quasi nicht umzusetzen.

Die SCS bietet als einzige Methode einen ortsgerichteten *in-vivo*-Einbau einer einzelnen unnatürlichen Aminosäure als Folge eines Stopp-Codons im Zielgen (*cf.* Abbildung 18). Folglich wird eine hohe Ortsauflösung generiert, welche die Charakterisierung von Mikroumgebungen möglich macht. Mithilfe der SCS sollten verschiedene, die Kanalpore flankierende Aminosäuren gegen einen IR-Marker substituiert werden. Nachfolgende schwingungsspektroskopische Messungen sollten Aufschluss über lokale Solvatisierungsänderungen innerhalb des Photozyklus geben.

Da die Integration der meisten IR-aktiven Aminosäuren für den Einsatz in *Escherichia coli* entwickelt wurde (*cf.* Tabelle 8), wurde zu Beginn der Arbeit versucht einige ChRs in dem Eubakterium zu exprimieren. Neben der Vielzahl an orthogonalen Paaren, bietet *E. coli* aber auch weitere substantielle Vorteile gegenüber *Pichia pastoris*, Säugetier- und Insektenzellen. *E. coli* hat die schnellste Generationszeit, verursacht die geringsten Kosten für die Expression und ermöglicht eine einfache Handhabung, leichtes Upscaling sowie schnelle genetische Manipulation *via* extrachromosomaler Vektoren. Zu Beginn der Arbeit gab es jedoch keine Berichte über eine erfolgreiche bakterielle Expression eines ChRs. Da das Ausbleiben von PTMs zumeist als Hauptgrund für die unfunktionale Expression in dem niederen Prokaryot angeführt wurde, sollte die Glykosylierungskassette des Eubakteriums *Campylobacter jejuni* neben dem ChR koexprimiert werden (*cf.* Abbildung 17). Überdies sollte die expressionssteigernde Wirkung der Fusionierung des Auxiliäres Mistic an ChR evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten Medien wurden entsprechend der jeweiligen Rezeptur in Tabelle 9 angefertigt und mittels thermischer Behandlung (121 °C, 20 min, Autoklav) sterilisiert. LB-Agar (engl. *lysogeny broth*) wurde nach dem Autoklavieren homogenisiert und jeweils 20 - 25 mL in Plastikpetrischalen ($d = 10$ cm) gefüllt. Falls das feste Nährmedium anschließend zu Selektionierungszwecken eingesetzt werden sollte, wurde vorab die gewünschte Menge Antibiotikum (cf. Tabelle 19) zugesetzt. Im Falle von SOB (engl. *super optimal broth*) und SOC wurden einmolare wässrige Stammlösungen der Magnesiumsalze bzw. der Glucose angefertigt und nach Sterilfiltration zu der autoklavierten Lösung der übrigen Bestandteile gegeben.

2.1.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

TfbI- und TfbII-Puffer wurden in Analogie zu Tabelle 10 hergestellt, sterilfiltriert ($0.22\ \mu\text{m}$) und bis zur Anwendung im Kühlschrank gelagert. Eine Vorkultur (10 - 50 mL SOB- bzw. LB-Medium) wurden mit 10 μL einer entsprechenden *E. coli*-Zellsuspension (cf. Tabelle 11 & Tabelle 20) inokuliert und bei 37 °C im Inkubator (190 rpm) über Nacht (12 - 18 h) kultiviert. Die Hauptkultur (800 mL LB) wurde mit der Vorkultur auf eine optische Dichte von $\text{OD}_{600} \sim 0.05$ eingestellt und bis $\text{OD}_{600} = 0.3 - 0.4$ im Inkubator vermehrt. Anschließend wurde zentrifugiert (7 min, 2400 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 50 mL TfbI resuspendiert und 10 - 15 min auf Eis gelagert. Die durch erneute Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, 4 °C) abgeschiedenen Zellen wurden mit 6.5 mL TfbII vermengt und wiederum für 10 - 15 min auf Eis gestellt. Aliquots zu 50 - 100 μL wurden in $\text{N}_2(\text{l})$ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Kryokonservierung von *E. coli*

300 μL einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in Kryoröhrchen (Simport Scientific) überführt, mit 150 μL Glycerol (86 % (v/v), Carl Roth) versetzt und in $\text{N}_2(\text{l})$ schockgefroren bevor sie bei -80 °C dauerhaft gelagert wurden.

Tabelle 9: Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*.

Medium	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller / Bezugsquelle
2xM9-Medium (M9 mit doppelter Konzentration an Glucose und NH_4Cl)	Kultivierung	1.6 % (w/v) D-Glucose 74.8 mM NH_4Cl <u>Spurenelemente:</u> 50 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 10 μM ZnSO_4 2 μM CoCl_2 2 μM Na_2SeO_3 2 μM H_3BO_3 2 μM CuCl_2 2 μM NiCl_2 2 μM Na_2MoO_4 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ <u>M9-Salze (pH 7.4):</u> 90 mM Na_2HPO_4 59 mM KH_2PO_4 17.2 mM NaCl 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Thiaminhydrochlorid 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ D(+)-Biotin	Carl Roth Carl Roth Reanal Carl Roth Fluka Merck Fluka Sigma-Aldrich Merck Merck Merck Sigma-Aldrich Merck Carl Roth Carl Roth Carl Roth Carl Roth Fluka Sigma-Aldrich 2xM9 wurde von Dr. Mathes (ResearchGate, Berlin, Deutschland; ehemals AG Hegemann, HU Berlin) bereitgestellt.
LB	Kultivierung	1.0 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 1.0 % (w/v) NaCl dH_2O pH 7.5	Becton Dickinson Becton Dickinson Carl Roth
LB-Agar	Kultivierung / Plattierung	LB inkl. 1.5 % (w/v) Agar	Becton Dickinson
SOB	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	2.0 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dH_2O pH 7.5	Becton Dickinson Becton Dickinson Carl Roth Carl Roth Carl Roth Carl Roth
SOC	Transformation	SOB mit 20 mM D-Glucose	Carl Roth

2.1.4 Transformation von *E. coli* mit Fremd-DNA

Ein Aliquot (25 - 100 μL) tiefgefrorener chemokompetenter *E. coli*-Zellen (cf. Tabelle 11 & Tabelle 20) wurde langsam auf Eis aufgetaut und nach ca. 5 - 10 min mit 15 - 30 ng DNA (Amplifikation von Plasmid-DNA, cf. Kapitel 2.2.3) bzw. 10 - 40 μL DpnI-behandeltem PCR-Ansatz (Ortsgerichtete Mutagenese, cf. Kapitel 2.2.5) versetzt. Die Zellsuspension wurde weitere 10 - 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem kurzzeitigen Hitzeschock (45 s, 42 °C) ausgesetzt. Es folgten weitere 2 min auf Eis bevor die Zellen in vorgewärmtem

(37 °C) LB- oder SOC-Medium (0.25 - 1 mL) resuspendiert wurden und für 1 h bei 37 °C unter regem Schütteln (650 rpm) kultiviert wurden. 100 - 250 µL der Zellsuspension wurden anschließend auf vorgewärmten LB-Agar-Platten (inkl. des relevanten Antibiotikums, cf. Tabelle 19) mithilfe eines sterilen Drigalsky-Spatels möglichst homogen über die gesamte Wachstumsfläche verteilt und über Nacht (> 16 h) im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Morgen zeichneten sich bei erfolgreicher Transformation einzelne Bakterienkolonien ab.

Tabelle 10: Puffer für die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen.

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
TfbI	30 mM Kaliumacetat pH 5.8	Merck
	100 mM KCl	Carl Roth
	50 mM MnCl ₂ · 2 H ₂ O	Fluka
	15 % (v/v) Glycerol ddH ₂ O	Carl Roth
TfbII	10 mM MOPS pH 7.0	Carl Roth
	7.5 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Carl Roth
	10 mM KCl	Carl Roth
	15 % (v/v) Glycerol ddH ₂ O	Carl Roth

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1 % (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM TRIS, 0.001142 % (v/v) reine Essigsäure, 50 mM Na₂EDTA · 2 H₂O, pH 8.3, Carl Roth) inklusive Ethidiumbromid (1 µg/mL, Stammlösung: 10 mg/mL, Sigma-Aldrich) bzw. SYBR Green (1:10.000, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1x Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) versetzt, in die auspolymerisierten Taschen geladen und in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer bei 90 - 120 V aufgetrennt. Die Größe der DNA-Banden wurde mithilfe eines DNA-Markers (O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific) unter UV-Licht (Ethidiumbromid) bzw. Blaulicht (SYBR Green) abgeschätzt.

2.2.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Immobilisierte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (Ethidiumbromid) bzw. unter Blaulicht (SYBR-Green) mit einem Skalpell von der umgebenen Agarosematrix befreit und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach dem Herstellerprotokoll

aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch (Ultraspec 1100 Pro Spectrophotometer bzw. BioSpectrometer basic, Eppendorf AG) bestimmt.

2.2.3 Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA

Je nach gewünschter DNA-Menge wurden 5 - 250 mL LB-Medium inkl. des entsprechenden Antibiotikums (*cf.* Tabelle 19) mit einer Kolonie eines *E. coli*-Transformanten (Tabelle 11) bzw. einer kleineren Übernachtskultur inokuliert (1:100) und über Nacht (> 16 h) bei 37 °C und 180 - 200 rpm inkubiert. Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit kommerziell erhältlichen Kits (NucleoSpin Plasmid EasyPure; NucleoBond Xtra Midi bzw. Maxi, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Quantität und Reinheit wurden im Anschluss photometrisch überprüft. Der relevante DNA-Abschnitt, welcher für das entsprechende Zielgen kodiert, wurde je nach Größe mit 1 (≤ 1.000 bp) - 3 (≤ 2.700 bp) Sequenzierungsschritten verifiziert (*cf.* Kapitel 2.2.10).

Tabelle 11: *E. coli*-Stämme für die Amplifikation von extrachromosomaler DNA und für molekularbiologische Klonierungsarbeiten. Tet^R, Tetracyclin-Resistenz; Str^R, Streptomycin-Resistenz.

Stamm	Verwendung / Genotyp	Hersteller
XL1-Blue	Klonierungsstamm, Plasmid-Amplifikation, defizient in Rekombinasen und Endonuklease A, Genotyp: <i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]</i> hsdR17(τ_K m κ^+), Tet ^R	Stratagene California (jetzt: Agilent Technologies)
DH10B	Klonierungsstamm, Plasmid-Amplifikation, defizient in Rekombinasen und Endonuklease A, Genotyp: F ⁻ <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 ψ80/lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻</i> , Str ^R	Invitrogen (jetzt: Thermo Fisher Scientific)

2.2.4 Design und Synthese von Oligonukleotiden

Die verwendeten Primer wurden je nach Einsatzgebiet *in-silico* (GENTle) designt und anschließend von SMB (Services in Molecular Biology GmbH) oder IDT (Integrated DNA Technologies) synthetisiert. Komplette Gensequenzen wurden dem Codongebrauch des verwendeten Expressionswirts angepasst (GENTle) und nach Entfernung ungewünschter Restriktionsschnittstellen bei GenScript bestellt.

2.2.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Einführung von Punktmutationen wurde sich der ortsgerichteten Mutagenese (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene California) mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988) bedient. Zwei komplett bzw. partiell komplementäre Primer mit 3'-Überhängen (Zheng *et al.*

2004) mit einer Gesamtlänge von 20 - 35 bp und der entsprechenden Mutation wurden synthetisiert (cf. Kapitel 2.2.4). Es wurden PCR-Ansätze entsprechend Tabelle 12 zusammenpipettiert und die DNA im Rahmen des Temperaturprotokolls von Tabelle 13 amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wurde die methylierte parentale DNA mit DpnI (1 μ L, 37 °C, 45 min, Thermo Fisher Scientific) verdaut. Die Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese (cf. Kapitel 2.2.1) (Reaktionsansatz a 10 μ L) überprüft. 25 - 100 μ L chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden *via* Hitzeschock (cf. Kapitel 2.1.4) mit 10 - 40 μ L des DpnI-behandelten PCR-Ansatzes transformiert und auf LB-Agar inkl. Antibiotikum (cf. Tabelle 19) über Nacht inkubiert. 5 mL LB-Medium inkl. Antibiotikum wurde mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mittels des NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (Macherey-Nagel). Die Sequenz des relevanten DNA-Abschnitts wurde mithilfe flankierender Oligopeptide (cf. Tabelle 15) bei LGC Genomics GmbH bzw. GATC Biotech AG ermittelt.

Tabelle 12: Zusammensetzung PCR-Ansatz für die ortsgerichtete Mutagenese. dNTP, Desoxynukleosidtriphosphat.

Bestandteil	V / μ L	Finale Konz.	Hersteller
DNA-Templat	50 ng	1 ng / μ L	-
Vorwärts-Primer (10 μ M)	2.5	0.5 μ M	SMB GmbH / IDT
Rückwärts-Primer (10 μ M)	2.5	0.5 μ M	SMB GmbH / IDT
dNTP-Mix (2 mM)	5.0	200 μ M	Thermo Fisher Scientific
DMSO	1.5	3 % (v/v)	Thermo Fisher Scientific
5xPhusion HF Puffer	10	1x	Thermo Fisher Scientific
Phusion Polymerase (2 U/ μ L)	1.0	0.04 U/ μ L	Thermo Fisher Scientific
ddH ₂ O	Auf 50	-	-

Tabelle 13: PCR-Temperaturprotokoll für die ortsgerichtete Mutagenese. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (98 °C, 2 min) beginnt die zyklische Reaktion aus Denaturierung (98 °C), Primerhybridisierung (engl. *annealing*, 55 - 65 °C) und Elongation (72 °C). In Abhängigkeit der DNA-Region, in welcher sich die Oligonukleotide anlagern sollten, wurde der Primerhybridisierungsschritt weggelassen oder ein Temperaturgradient angelegt.

T / °C	t / min	Nr. Zyklen
98	2.0	1
98	0.5	20 - 25
55 - 65	0.5	
72	0.5 / kbp	
72	0.5 / kbp	1
4	∞	

2.2.6 Einführung von DNA-Sequenzen

Für die Einführung von zusätzlichen Restriktionsschnittstellen bzw. beliebiger DNA-Fragmente wurden entsprechende Primer (≥ 20 bp Homologie zum DNA-Templat mit gewünschtem Überhang) *in-silico* (GENtle) designt, synthetisiert (SMB GmbH bzw. IDT) und in einem zu Tabelle 12 analogen Ansatz zusammenpipettiert. DNA-Amplifizierung erfolgte nach dem in Tabelle 14 beschriebenen Temperaturprotokoll. Banden der gewünschten Größe wurden nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (*cf.* Kapitel 2.2.2) und aufgereinigt (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel). Wenn gewünscht, wurde die isolierte DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (FastDigest, Thermo Fisher Scientific) geschnitten und in einen linearisierten dephosphorylierten Vektor kloniert (*cf.* Kapitel 2.2.9).

Tabelle 14: PCR-Temperaturprotokoll für die Einführung von DNA-Fragmenten.

T / °C	t / min	Nr. Zyklen
98	2.0	1
98	0.5	30
62	0.5	
72	0.5 / kbp	
72	0.5 / kbp	1
4	∞	

2.2.7 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde ein zu Tabelle 12 analoger Ansatz pipettiert, nur das anstelle der DNA der PCR-Ansatz mit einem *E. coli*-Transformanten inokuliert wurde. Es wurde ein Temperaturprotokoll wie in Tabelle 14 verwendet. Die Primerhybridisierungstemperatur wurde den eingesetzten Oligopeptiden angepasst. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (*cf.* Kapitel 2.2.1) analysiert.

2.2.8 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der Größe und Integrität von Nukleotidsequenzen wurde die zu untersuchende DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. Dazu wurde ein 20 μ L-Ansatz mit 100 ng DNA, Restriktionsenzym(en) (jeweils 0.5 - 1.0 μ L, FastDigest, Thermo Fisher Scientific), 1x FastDigest Green Puffer (Thermo Fisher Scientific) und ddH₂O für 30 - 45 min bei 37 °C inkubiert. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden anschließend der Größe nach *via* Agarosegelelektrophorese (*cf.* Kapitel 2.2.1) aufgetrennt und unter UV- bzw. Blaulicht inspiziert.

2.2.9 Ligation

Um eine gerichtete Insertion des Zielgens zu ermöglichen, wurde der Vektor mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten (cf. Kapitel 2.2.8). Zusätzlich erfolgte eine enzymatische Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific), um die Religation des leeren Vektors zu inhibieren. Dazu wurden 20 μ L Ansätze mit 1 - 2 μ g DNA, 1x FastDigest Puffer, jeweils 0.5 μ L Restriktionsenzym, 0.5 μ L FastAP und ddH₂O pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde das zu insertierende Gen (engl. *insert*) mit denselben Restriktionsenzymen in analoger Art und Weise, aber ohne Phosphatase, behandelt. Die geschnittenen Fragmente wurden entweder nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert und isoliert (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel) (cf. Kapitel 2.2.2) oder der Restriktionsansatz direkt mit dem identischen Kit gereinigt.

Für die Ligation wurden 100 ng linearisierte Vektor-DNA mit dem Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 zusammengeführt. Neben den Nukleotidfragmenten enthielt der 20 μ L Ligationsansatz 1x T4 Ligase Puffer (Thermo Fisher Scientific), 1.0 μ L T4 Ligase (Thermo Fisher Scientific) sowie ddH₂O und wurde für 1 h bei 18 °C inkubiert. Als Religationskontrolle wurden dieselben Komponenten, allerdings ohne Insert, zusammenpipettiert und analog prozessiert. Chemokompetente *E. coli*-Zellen (25 - 100 μ L) wurden im Anschluss mit den kompletten Ansätzen per Hitzeschock-Methode (cf. Kapitel 2.1.4) transformiert. Bakterielle Einzelkolonien beider Ansätze wurden am nächsten Tag gezählt und miteinander verglichen. In Abhängigkeit des Verhältnisses wurden 2 - 5 Klone gepickt, in LB-Medium vermehrt und deren DNA mit einem Kit (NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits, Macherey-Nagel) isoliert. Eine erfolgreiche Ligation wurde mittels Sequenzierung (cf. Kapitel 2.2.10) überprüft, ggf. wurde eine Restriktionsanalyse vorangestellt. Alternativ konnten positive Klone vor der Sequenzierung mithilfe der Kolonie-PCR (cf. Kapitel 2.2.7) selektiert werden.

Tabelle 15: Oligonukleotide für die Sequenzierung einzelner Plasmide. Falls beim Sequenzierungsanbieter vorhanden, sind die Namen der verwendeten Oligonukleotide genannt (in Klammern).

Vektor	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
pASK7/43plus	pASK-fw (5'-GAGTTATT-TTACCACTCCCT-3'), ColE-ori (GATC)	pASK-rev (5'-CGTTTACC-GCTACTGCG-3')
pBAD/Myc-HisB	pBAD-FP (GATC)	BAD-HisA-R (LGC)
pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1-FP (GATC)	pcDNA3.1-RP/1 (GATC)
pET21b/27b(+)/28c(+)	T7 fw (GATC)	pET-RP (GATC)
pMT4	pMT4 fw (5'-CCACTTTGC-CTTCTCTCCACAGG-3')	SPR7 rev (5'-GATAAAAT-CCTACCAGCCTTCAC-3')
pUC57	M13-FP (GATC)	M13-RP (GATC)

2.2.10 Sequenzierungen

Die Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte erfolgte bei LGC Genomics GmbH bzw. GATC Biotech AG mithilfe zweier flankierender Primer aus Tabelle 15 nach den Vorgaben der Anbieter. Da für gängige Vektorsysteme komplementäre Oligonukleotide beim Sequenzierungsanbieter vorrätig sind, wurden nur einzelne Primer gesondert synthetisiert.

2.3 Expression in *Escherichia coli*

2.3.1 Gene

Tabelle 16: Gene für die Expression in *E. coli*. Die Sequenzen der ChRs und der beiden HKRs wurden an den Codon-Gebrauch von *E. coli* angepasst (e). Zugehörigkeiten: 1) Jawaharlal Nehru University, Neu-Delhi, Indien; 2) Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan; ehemals AG Hegemann (HU Berlin); 3) Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Deutschland; 4) Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.

Gen	Bezeichnung	GenBank / Protein-ID	Bezugsquelle / Referenz
eCaChR1	ChR1 aus <i>Chlamydomonas (Chloromonas) augustae</i> , 354 AS	JN596951	Gene Script, Hou <i>et al.</i> , 2012
eCrChR1	ChR1 aus <i>C. reinhardtii</i> , 317 AS	AF385748	Prof. Suneel Kateriya ¹ Kateriya, 2004; Nagel <i>et al.</i> , 2002
eCrChR2	ChR2 aus <i>C. reinhardtii</i> , 310 AS	AAM15777	Gene Script
eDsChR1	ChR1 aus <i>Dunaliella salina</i> , 376 AS	JQ241364	Dr. Satoshi P. Tsunoda ² , Zhang <i>et al.</i> , 2011
eHpChR1	ChR1 aus <i>Haematococcus (lacustris) pluvialis</i> , 353 AS	JN596950	Gene Script, Hou <i>et al.</i> , 2012
ePgChR1	ChR1 aus <i>Pyramimonas gelidicola</i> , 279 AS	JQ241366	Gene Script, Zhang <i>et al.</i> , 2011
eCrCop5 (HKR1)	Cop5 aus <i>C. reinhardtii</i> bzw. Histidin-Kinase-Rhodopsin-1, 265 AS	AY272055.2	Gene Script, Kateriya <i>et al.</i> 2004
eOtCop5	Cop5 aus <i>Ostreococcus taurii</i> , 341 AS	XP_003083892	Dr. Meike Luck ³ , Gene Script, Derelle <i>et al.</i> , 2006
Mistic	“ <i>membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs</i> ”, Membranprotein aus <i>Bacillus subtilis</i> , 110 AS	AY874162	Prof. Suneel Kateriya ¹ , Roosild <i>et al.</i> , 2005
pelB	Periplasmatisches Signalpeptid der Pektat-Lyase B (PelB, MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA) aus dem Pectobakterium <i>Erwinia carotovora</i>	AAA24848	Novagen (Merck KGaA), Lei <i>et al.</i> , 1987
pgl	Glykosylierungsgencluster aus <i>Campylobacter jejuni</i> kodiert für Transferase (PglC), Dehydratase (PglF), Transaminase (PglE), Transacetylase (PglD), Glykosyltransferasen (PglA/H-I), Oligosaccharyltransferase (PglB) & PglK (ABC-Transporter, Floppase)	AF108897.1	Prof. Markus Aebi ⁴ , Szymanski <i>et al.</i> , 1999; Wacker <i>et al.</i> , 2002

2.3.2 Vektoren

Tabelle 17: Vektoren für die Expression in *E. coli*. AHT, Anhydrotetracyclin; Cm^R, Resistenzgen gegen Chloramphenicol; Tet^R, Tetracyclin-Resistenz; Amp^R, kodiert für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz); Kn^R, Resistenzgen gegen Kanamycinsulfat; Zugehörigkeiten: 1) Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz; 2) ResearchGate GmbH, Berlin, Deutschland; chemals AG Hegemann (HU Berlin); 3) Jawaharlal Nehru University, Neu-Delhi, Indien; 4) Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan; chemals AG Hegemann (HU Berlin).

Vektor	Eigenschaften	Bezugsquelle / Referenz
pACYC184	Cm ^R , Tet ^R , konstitutive Expression	Prof. Markus Aebi ¹
pASK43plus	N-terminaler His ₆ -Tag & C-terminaler Strep-Tag II (WSHPQFEK), Amp ^R , starker <i>tetA</i> -Promoter, induzierbar (AHT)	Dr. Tilo Mathes ² , IBA Lifesciences, Skerra, 1994; Voss & Skerra, 1997
pASK7plus	N-terminaler Strep-Tag II (WSHPQFEK), Amp ^R , starker <i>tetA</i> -Promoter, induzierbar (AHT)	Dr. Tilo Mathes ² , IBA Lifesciences, Skerra, 1994; Voss & Skerra, 1997
pBAD/Myc-HisB	C-terminaler His ₆ - und Myc-Tag (EQKLISEEDL), Amp ^R , moderater <i>araBAD</i> -Promoter (P _{BAD}), AraC (Transkriptionsregulator), induzierbar (L(+)-Arabinose)	Dr. Tilo Mathes ² , Thermo Fisher Scientific, Guzman <i>et al.</i> , 1995
pET21a	N-terminaler T7-Tag (MASMTGGQMG), C-terminaler His ₆ -Tag, Amp ^R , sehr starker T7-Promoter, induzierbar (IPTG)	Prof. Suneel Kateriya ³ , Studier & Moffatt, 1986
pET27b(+)	N-terminales <i>pelB</i> (cf. Tabelle 16), C-terminaler HSV-Tag (SQPELAPED) & His ₆ -Tag, Kn ^R , sehr starker T7-Promoter, induzierbar (IPTG)	Dr. Satoshi P. Tsunoda ⁴ , Novagen, Studier & Moffatt, 1986
pET28c(+)	N-terminaler, T7-Tag (MASMTGGQMG) & His ₆ -Tag, Kn ^R , sehr starker T7-Promoter, induzierbar (IPTG)	Dr. Tilo Mathes ² , Novagen, Studier & Moffatt, 1986

Tabelle 18: Induktorkonzentrationen der induzierbaren Expressionsvektoren.

Induktor	Expressionsplasmid	Stammkonz.	Finale Konz. (Verdünnung)	Hersteller
Anhydrotetracyclin-Hydrochlorid (AHT)	pASK7plus, pASK43plus	2 mg/mL in Dimethylformamid (DMF)	200 ng/mL (1:10.000)	Acros Organics (jetzt: Thermo Fisher Scientific)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	pET21a, pET27b(+), pET28c(+)	1 M in ddH ₂ O	0.5 mM (1:2.000)	Carl Roth
L(+)-Arabinose	pBAD/Myc-HisB	20 % (w/v) in ddH ₂ O	0.2 % (w/v) (1:100)	Carl Roth

Tabelle 19: Antibiotikakonzentration für die Selektionierung von Transformanten.

Name	Verwendung	Stammkonz.	Finale Konz. (Verdünnung)	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz (Amp)	Selektion von mit pET21a, pASK7plus, pASK43plus & pBAD/Myc-HisB transformierten Zellen	100 mg/mL in ddH ₂ O	100 µg/mL (1:1.000)	Carl Roth
Chloramphenicol (Cm)	Selektion von mit pACYC184-transformierten Zellen	34 mg/mL in Ethanol (<i>p.a.</i>)	34 µg/mL (1:1.000)	Sigma-Aldrich
Gentamycinsulfat (Gent)	Selektion für Kotransformation von ArcticExpress (DE3) RIL-Zellen mit pACYC_cpn10/cpn60 (psychrophile Chaperone) (<i>cf.</i> Tabelle 20)	20 mg/mL in ddH ₂ O	20 µg/mL (1:1.000)	Sigma-Aldrich
Kanamycinsulfat (Kn)	Selektion von mit pET27b(+) & pET28c(+) transformierten Zellen	10 mg/mL in ddH ₂ O	100 µg/mL (1:100)	Carl Roth

2.3.3 Stämme

Tabelle 20: *E. coli*-Expressionsstämme. Tet^R, Tetracyclin-Resistenz; Str^R, Streptomycin-Resistenz; Gent^R, Gentamycin-Resistenz; Zugehörigkeiten: 1) chemals AG Möglich (Universität Bayreuth, Deutschland); 2) ResearchGate GmbH, Berlin, Deutschland; chemals AG Hegemann (HU Berlin); 3) Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.

Stamm	Eigenschaften / Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
ArcticExpress (DE3) RIL	Expression bei Temperaturen von 4 - 12 °C durch Koexpression der kalteadaptierten Chaperone Cpn10 und Cpn60 aus dem psychophilen Bakterium <i>Oleispira antarctica</i> , Zellen kotransformiert mit entsprechenden pACYC-Vektor mit Gent ^R . Konstitutive Expression von tRNAs für Arginin- (R), Isoleucin- und Leucin-Codon(s) auf pSC101-Plasmid (RIL), DE3: Chromosomale Kodierung für T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren <i>lacUV5</i> -Promoters sowie <i>lacI</i> . Genotyp: <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (_{FB} ⁻ _{MB} ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^R <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^R] [<i>argU ileY leuW</i> Str ^R]	Roman Schubert ¹ , Agilent Technologies, Ferrer <i>et al.</i> , 2003
BL21(DE3)	Expressionsstamm, Derivat von B834-Stamm (Wood, 1966), defizient in Lon- & OmpT-Protease, DE3 (s.o.), Genotyp: <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS</i> (_{FB} ⁻ _{MB} ⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)	Dr. Tilo Mathes ² , Studier & Moffatt, 1986
C41(DE3)	Derivat von BL21(DE3), Mutante für Expression von Membranproteinen	Dr. Tilo Mathes ² , Miroux & Walker, 1996
C43(DE3)	Derivat von BL21(DE3), Doppelmutante für Expression von Membranproteinen	Dr. Tilo Mathes ² , Miroux & Walker, 1996
CLM24	W3110 (K-12 Derivat, Genotyp: F ⁻ λ ⁻ <i>rph-I</i> IN(<i>rrnD-rrnE</i>) 1) ohne O-Antigen-Ligase (<i>Avaal</i>)	Prof. Markus Aebi ³ , Feldman <i>et al.</i> , 2005

2.3.4 Kultivierung, Induktion und Zellernte

LB-Medium inkl. des entsprechenden Antibiotikums (*cf.* Tabelle 19) wurde entweder mit 5 μL einer Glycerol-Kultur eines *E. coli*-Transformanten (Expressionstest, *cf.* Tabelle 20) oder mit einer kleineren Übernachtskultur auf eine optische Dichte von $\text{OD}_{600} = 0.05$ angeimpft und bei 30 - 37 °C und 170 - 190 rpm bis $\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.6$ kultiviert. Die Induktion der induzierbaren Vektoren (pET, pASK & pBAD) erfolgte dann durch die Zugabe des korrespondierenden Induktors (*cf.* Tabelle 18). Zeitgleich wurde auch der Cofaktor all-*trans*-Retinal (5 - 10 μM) der Zellsuspension zugesetzt. Bei einer kontinuierlichen Expression bei 37 °C wurden die Zellen 1.5 - 3 h post-induktional durch Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm, 4 °C) geerntet und entweder direkt weiterverarbeitet oder erst eingefroren ($\text{N}_2(\text{l})$, Lagerung bei -80 °C).

Alternativ wurden die Kulturen bei Erreichen der oben genannten OD_{600} 1 h bei 19 °C vermehrt und erst dann der Induktor hinzupipettiert. Die Expression bei 19 °C wurde über Nacht (12 - 18 h) fortgesetzt und am nächsten Morgen durch Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm) bei 4 °C beendet. Das Nasszellgewicht wurde notiert. Bei Verwendung von ArcticExpress (DE3) RIL-Zellen (Agilent Technologies) wurde die Hauptkultur bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0.4 - 0.6 bei 30 °C kultiviert und dann 10 min bei 10 °C geschüttelt. Es folgte die Induktion und die Kultivierung bei 10 °C über Nacht (12 - 16 h).

2.3.5 Aufreinigung

(Aufgetaute) Zellpellets wurden auf Eis in Resuspensionspuffer (50 mM TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Stammlösung: 0.1 M in Isopropanol, Carl Roth) & DNaseI (F. Hoffmann-La Roche AG)) resuspendiert. Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (Digital Sonifier, Branson) in 2 - 5 Zyklen a 25 - 30 s bei einer Amplitude von 20 - 40 % bis zur Klärung der Zellsuspension. Zwischen jedem Zyklus wurden die Proben 30 s auf Eis gekühlt. Zelluläre Komponenten wurden im Anschluss mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Im ersten Zentrifugationsschritt bei niedriger Drehzahl (15 min, 13.2 - 16 krpm, 4 °C) erfolgte die Trennung von Zelldebris und Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*, IB) von Cytoplasma und Membranfraktion (Überstand). Der Überstand wurde anschließend einer Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation (45 - 60 min, 45 - 60 krpm, 4 °C) unterzogen, in welchem die Membranfraktion auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens abgeschieden wurde. Die lösliche Cytoplasmafraktion wurde abgenommen.

Membranständige Proteine wurden anschließend in Solubilisierungspuffer (Resuspensionspuffer inkl. 1 - 2 % (w/v) DDM (*n*-Dodecyl- β -D-maltopyranosid, Stammlösung: 10 % (w/v) in ddH₂O, Glycon Biochemicals GmbH) & 10 mM Imidazol (Carl Roth)) in einem Glas-Potter mit Pistill (Sartorius AG) auf Eis unter regelmäßigem Homogenisieren für 90 min in Lösung überführt und mittels Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation (15 - 45 min, 45 - 60 krpm, 4 °C) von der Lipidmembran getrennt. Aggregierte und fehlgefaltete Proteine des IB wurden ebenfalls einer Detergensbehandlung (Solubilisierungspuffer) und nachfolgender Zentrifugation (10 min, 13.2 krpm, 4 °C) unterzogen, wobei der lösliche Überstand aufbewahrt

wurde. Im Rahmen von Expressionstests wurden die erhaltenen Zellfraktionen mit SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, cf. Kapitel 2.6.2) nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels Western Blot (cf. Kapitel 2.6.3) auf die erfolgreiche Expression des Zielproteins bzw. des Affinitätspeptids analysiert. Zur Kontrolle wurden ggf. Zellfraktionen von nichtinduzierten Zellen in die Proteinanalytik miteinbezogen.

Photorezeptoren wurden mithilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei wurde sich entweder der starken Wechselwirkung zwischen immobilisierten Nickelionen und proteinogenen Histidinen (Immobilisierte-Metallionen Affinitätschromatographie, IMAC) oder zwischen modifiziertem Streptavidin (Strep-Tactin) und einem artifiziellen Liganden (Strep-Tag II, WSHPQFEK) bedient. Für die IMAC wurde das den ligandentragende (Nickel) Trägermaterial (Nitrilotriessigsäure-Agarose, NTA, Quiagen) in eine Säule überführt, mit 10 - 20 Säulenvolumen (engl. *column volume*, CV) ddH₂O gewaschen und in 20 - 30 CVs Solubilisierungspuffer ohne DDM equilibriert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die solubilisierete Membranfraktion wurde vorsichtig auf die Säule appliziert und bei einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 mL/min auf die Säule geladen. Um möglichst viel rekombinantes Protein zu binden, wurde der Durchfluss (engl. *flow through*, FT) 2 - 3 Mal erneut aufgetragen bzw. das Säulenmaterial für 30 - 60 min mit der Proteinlösung inkubiert. Anschließend wurde die feste Phase mit 25 - 50 CVs Waschpuffer (50 mM TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 0.03 % (w/v) PMSF & 0.03 % (w/v) DDM) gewaschen. Ein Aliquot des FT wurden für proteinanalytische Zwecke aufbewahrt. Immobilisiertes Protein wurde mit 7 - 15 CVs Elutionspuffer (Waschpuffer mit 250 - 500 mM Imidazol) vom Liganden getrennt und in Fraktionen zu 1 - 2 mL gesammelt.

Analog wurde die Säule des modifizierten Streptavidins (Strep-Tactin Superflow, IBA Lifesciences) präpariert und mit 5 - 10 CVs mit Puffer W (100 mM TRIS pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA · 2 H₂O, Carl Roth) gewaschen. Nach wiederholter Applikation der Proteinlösung wurde die stationäre Phase mit 6 - 10 CVs Puffer W inkl. 0.1 % (w/v) DDM & 0.03 mM PMSF gewaschen. Gebundene Photorezeptoren wurden in Puffer E (100 mM TRIS pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA · 2 H₂O, 0.1 % (w/v) DDM & 2.5 mM Desthiobiotin (IBA Lifesciences)) eluiert.

Fraktionen wurden UV-vis-spektroskopisch (Cary 300 Bio, Varian Inc. / Agilent Technologies) (cf. Kapitel 2.7.2) und ggf. proteinanalytisch (PAGE und/oder Western Blot) untersucht. Positive Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert (MWCO = 50 kDa, Ausschlussgrenze, engl. *molecular weight cut-off*, Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, Merck KGaA) und dialysiert (2x 4 h bzw. 1x 12 - 14 h in 1 L Dialysepuffer (Resuspensionspuffer incl. 0.015 % (w/v) DDM), Float-A-Lyser, MWCO = 50 kDa, Carl Roth).

2.4 Expression in tierischen Säugerzellen

2.4.1 Gene

Tabelle 21: Gene für die Expression in tierischen Säugerzellen. Alle DNA-Sequenzen (außer tRNA aus *B. stearothermophilus*) sind humanadaptiert. Zugehörigkeiten: 1) Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Deutschland; 2) Universitäts-Herzzentrum Freiburg Bad Krozingen, Deutschland, ehemals AG Hegemann (HU Berlin); 3) Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MI, USA; 4) University of Tasmania, Hobart, Tasmanien; 5) Universität Bern, Bern, Schweiz; 6) Rockefeller University, New York City, NY, USA.

Gen	Bezeichnung	GenBank / Protein-ID	Bezugsquelle / Referenz
C1C2	Chimäre von Chr1 (H1-H5, 1-245 AS) & Chr2 (H6-H7, 207-309 AS) aus <i>C. reinhardtii</i> , 348 AS	PDB: 3ug9	Dr. Katja Stehfest ¹ Kato <i>et al.</i> , 2012
C1V1-25A	Chimäre von CrChr1 (H1-H2, 1-145 AS) & Chr1 aus <i>Volvox carteri</i> (H3-H7, 102-307 AS), 351 AS	AEL28923 (ohne E162T, V196I & G197A)	Dr. Franziska Schneider ² , Yizhar <i>et al.</i> , 2011; Prigge <i>et al.</i> , 2012
Chrimson	ChR aus <i>C. noctigama</i> , 350 AS	KF992060	Dr. Franziska Schneider ² , Prof. Edward Boyden ³ , Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
Chronos	ChR aus <i>Stigeoclonium helveticum</i> , 325 AS	KF992040	Dr. Franziska Schneider ² , Prof. Edward Boyden ³ , Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
CoChR	ChR aus <i>Chloromonas oogama</i> , 288 AS	KF992041	Dr. Franziska Schneider ² , Prof. Edward Boyden ³ , Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
CrChr2	Chr2 aus <i>C. reinhardtii</i> , 309 AS	AF461397	Dr. Franziska Schneider ² , Nagel <i>et al.</i> , 2003
CsChrimson	Chimäre von ChR aus <i>Chloromonas subdivisa</i> (1-79 AS) und Chrimson (85-350 AS), 345 AS	KJ995863.2	Johannes Vierock ¹ , Prof. Edward Boyden ³ , Klapoetke <i>et al.</i> , 2014
PgChr1	Chr1 aus <i>Pyramimonas gelidicola</i> , 279 AS	JQ241366	Prof. Feng Zhang ³
ReaChR	Chimäre aus CrChr1 (1-94 AS), VcChr1 (H1-H5, 50-201 AS & H7, 230-300 AS) & VcChr2 (H 6, 202-229 AS), L171I, 345 AS	KF448069.1	Dr. Franziska Schneider ² , Prof. John Lin ⁴ , Lin <i>et al.</i> , 2013
mCherry	Modifizierter monomerer Fluorophor aus <i>Discosoma</i> sp., 236 AS	AY678264	Johannes Vierock ¹ , Shaner <i>et al.</i> , 2004
mCerulean3	Monomeres CFP-Derivat	-	Christiane Grimm ¹ , Markwardt <i>et al.</i> , 2011
β -HK	Teile der β -Untereinheit der H ⁺ ,K ⁺ -ATPase aus dem Magen von <i>Rattus norvegicus</i> , 1-105 AS	J02649.1	Dr. Arend Vogt ¹ , Dr. Sonja Kleinlogel ⁵ , Shull, 1990; Geibel <i>et al.</i> , 2001
aaRS _{azF}	<i>E. coli</i> -Tyrosyl-tRNA-Synthetase mit Y37L, D182S, F183M, L186A spezifisch für <i>p</i> -Azido-L-phenylalanin (azF), 424 AS	-	Prof. Thomas P. Sakmar ⁶ , Deiters <i>et al.</i> , 2003
tRNA _{CUA}	Tyrosyl-tRNA mit modifiziertem Anticodon (CUA) aus <i>Homo sapiens</i> (1-55 bp) und <i>Bacillus stearothermophilus</i> (56-138 bp)	-	Prof. Thomas P. Sakmar ⁶ , Ye <i>et al.</i> , 2008

2.4.2 Vektoren

Der für die konstitutive Expression verwendete Vektor pMT4 ist ein β -Lactamase-Derivat (Ampicillin-Resistenz) von p91023(B) und trägt neben einem SV40-ori auch ein SV40-*enhancer*-Segment (Wong *et al.* 1985; Kaufman 1985), was eine hohe Replikationsrate der DNA in COS-Zellen induziert. Weitere kommerziell erhältliche Vektoren, welche einen SV40-ori tragen, und auch im Rahmen der Arbeit genutzt wurden, sind die Vektoren pcDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific) und pEGFP-N1/C1 (Clontech Laboratories / Takahara Holdings Inc.). Die in dem pMT4-Plasmid für das C-terminale 1D4-Affinitätspeptid kodierende DNA-Sektion wurde ggf. durch eine entsprechende Nukleotidsequenz für Polyhistidin (His₆ bzw. His₁₀) oder Strep-Tag II mittels Mutagenese und PCR ausgetauscht (Tabelle 22).

Tabelle 22: Vektoren für die Expression in tierischen Säugerzellen. Neo^R, Neomycin-Resistenz. Weitere Abkürzungen siehe Tabelle 17 bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Vektor	Eigenschaften	Induktion	Bezugsquelle / Referenz
pcDNA3.1(+)	SV40-ori, Amp ^R , Neo ^R , CMV-Promoter	konstitutiv	Thermo Fisher Scientific
pcDNA3.1-1D4	pcDNA3.1(+) mit C-terminalem 1D4-Tag	konstitutiv	Teil dieser Arbeit
pcDNA3.1-His ₁₀	pcDNA3.1(+) mit C-terminalem His ₁₀ -Tag	konstitutiv	Teil dieser Arbeit
pcDNA3.1-Strep	pcDNA3.1(+) mit C-terminalem Strep-Tag II (WSHPQFEK)	konstitutiv	Teil dieser Arbeit
pEGFP-N1/C1	SV40-ori, Expressionsvektor für Elektrophysiologie & Fluoreszenzmikroskopie, Neo ^R , Kn ^R	konstitutiv	Clontech Laboratories / Takahara Holdings Inc.
pMT4-1D4	SV40-ori, SV40- <i>enhancer</i> , C-terminaler 1D4-Tag (TETSQVAPA), Amp ^R , Tet ^R , adenoviraler Promoter	konstitutiv	Dr. Katja Stehfest (HU Berlin), Karnik <i>et al.</i> , 1988
pMT4-His ₁₀	pMT4 mit C-terminalem His ₁₀ -Tag	konstitutiv	Teil dieser Arbeit
pMT4-Strep	pMT4 mit C-terminalem Strep-Tag II (WSHPQFEK)	konstitutiv	Teil dieser Arbeit
pSVBpUC	Expressionsvektor für <i>H. sapiens</i> / <i>B. stearothermophilus</i> tRNA _{CUA} -Hybrid (zwei Kopien), Amp ^R	konstitutiv	Prof. Thomas P. Sakmar (Rockefeller University), Drabkin & RajBhandary, 1985

2.4.3 Zelllinien

COS-1

COS-Zellen (engl. *CV-1 in Origin*) sind immortalisierte Zelllinien aus Nierenfibroblasten der afrikanischen grünen Meerkatze (CV-1), welche durch Transfektion mit dem Simian-Virus 40-Genom (SV40) generiert wurden. Zur Stilllegung der Replikationsfähigkeit des Virus wurden sechs Basenpaare im viralen Replikationsursprung entfernt. Die in der Arbeit verwendete

Version, COS-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Nr. ACC 63), hat den kompletten „frühen Bereich“^E des Virusgenoms inseriert, welcher für den Replikationsinitiator, großes Tumor (T-)Antigen, kodiert (Gluzman 1981). Obwohl die transformierte Zelllinie das große T-Antigen konstitutiv exprimiert, fehlt ihr dennoch ein intakter SV40-ori, an welchen es binden kann. Daher bedarf es der Komplementation durch ein extrachromosomales Plasmid mit dem entsprechenden Replikationsursprung (*cf.* Tabelle 22).

HEK293

HEK293 (engl. *human embryonic kidney*, DSMZ-Nr. ACC 305) ist eine immortalisierte Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, welche mit DNA-Fragmenten von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde. Ähnlich wie bei COS-Zellen wurde nahezu ausschließlich DNA aus dem „frühen Bereich“ (~17 % des Genoms) inkorporiert, welcher für ein virusspezifisches T-Antigen kodiert (Graham *et al.* 1977).

Stabil transfizierter CrChR2-HEK293-Tet-On-Zelllinie

Die kommerziell erhältlichen HEK293-Tet-On Advanced Zellen (Clontech Laboratories / Takahara Holdings Inc.) basieren auf einer transformierten HEK293-Zelllinie, welche basal den tetracyclinabhängigen Transaktivator rtTA exprimiert (Gossen *et al.* 1995; Urlinger *et al.* 2000). Nach Transfektion mit einem Tetracyclin-Promoter-basierten Vektor (pTRE-Tight, Clontech Laboratories) und Zugabe des Derivats Doxycyclin, bindet rtTA das Antibiotikum und initiiert die Transkription (Resnitzky *et al.* 1994; Gossen *et al.* 1995).

Die stabile Zelllinie wurde von Dr. Katja Stehfest (AG Hegemann, HU Berlin) in den Laboratorien von Prof. Thomas P. Sakmar (Rockefeller University, New York City, NY, USA) generiert. Dazu wurde das Zielgen (*CrChR2*, 1 - 311 AS) in den Vektor pTRE-Tight kloniert. HEK293-Tet-On-Advanced-Zellen wurden im Anschluss neben dem *CrChR2*-kodierenden Plasmid mit dem selektionsmarkertragenden (Puromycin Dihydrochlorid) pBABE-Plasmid (Addgene) kotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung wurden die Zellen passagiert und mit der Selektionierung mittels des Antibiotikums Puromycin (1.5 µg/mL, Stammlösung: 12.2 mg/mL in ddH₂O, Sigma-Aldrich) begonnen. Im Laufe von mehreren Passagierungs- und Selektionierungsrunden zeichneten sich Kolonien einiger Transfektanten ab, welche nachfolgend kultiviert wurden. Die Expression wurde mit Doxycyclin (50 - 500 ng/mL; Stammlösung: 10 mg/mL in ddH₂O, Sigma-Aldrich) induziert und die am besten exprimierenden Transformanten *via* Western Blot und UV-vis-Spektroskopie ausgewählt. Der in der Arbeit verwendete Klon Nr. 6 lieferte neben einem starken Signal im Western Blot eine vernünftige Proteinqualität und -reinheit ($A_{280}/A_{450} \sim 2.6$; persönliche Kommunikation mit Dr. Katja Stehfest).

^E Der Name rührt daher, da diese Gene im infektiösen Zyklus als erstes transkribiert und exprimiert werden. Im Gegensatz dazu kodiert der „späte Bereich“ für die Hüllproteine des Virus (Kapsid).

HEK293T

HEK293T (DSMZ-Nr. ACC 635) sind Derivate von HEK293-Zellen, welche mit DNA einer thermolabilen Mutante des SV40 großen T-Antigens (*tsA1609*) transformiert wurden. Die Replikationsrate eines entsprechenden Plasmids inklusive SV40-ori kann somit über die eingestellte Temperatur reguliert werden, wobei Temperaturen von ≥ 40 °C die SV40-basierte Replikation inhibieren (Rio *et al.* 1985; DuBridge *et al.* 1987).

FreeStyle 293-F

FreeStyle 293-F-Zellen (Thermo Fisher Scientific) sind HEK293-Zellen, welche an das Suspensionswachstum adaptiert wurden. Sie standen in den Laboratorien von Prof. Thomas P. Sakmar (Rockefeller University) für die Expression zur Verfügung.

CHO-K1

CHO-K1 (engl. *chinese hamster ovary*, DSMZ-Nr. ACC 110) (Kao & Puck 1968) ist ein Subklon einer immortalisierten Zelllinie aus Eizellen des Chinesischen Zwerghamsters (Puck *et al.* 1958; Tjio & Puck 1958). Der Zelllinie fehlt eine entsprechende enzymatische Prolin-Synthese-Maschinerie und so erfordert es der exogenen Zugabe bei Kultivierung (Ham 1963; Kao & Puck 1967). CHO-K1 und einige Derivate wurden im Rahmen von Genomanalysen vollständig sequenziert (Xu *et al.* 2011; Wurm & Hacker 2011; Lewis *et al.* 2013).

2.4.4 Brutschrank

Säugetierzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im humiden Klima eines Brutschranks (HERAcell 240, Thermo Fisher Scientific) kultiviert.

2.4.5 Medien

Zur Kultivierung der adhätierenden Zellen wurde Vollmedium (Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium (DMEM) inkl. 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS, Biochrom GmbH / Merck KGaA)) eingesetzt. Es wurden zwei leicht modifizierte DMEM-Rezepturen verwendet (Tabelle 23) und in seltenen Fällen zusätzlich Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL, Kombistammlösung: 10.000 U/mL (Pen) & 10.000 µg/mL (Strep), Biochrom GmbH) zur Inhibierung von prokaryotischen Kontaminationen zugesetzt. Das verwendete Bikarbonat-Kohlensäure-Puffersystem (44 mM NaHCO₃, 5 % CO₂) hält einen pH-Wert von 7.65 aufrecht (Siggaard-Anderson-Nomogramm). Neben physiologischen Salzkonzentrationen, Spurenelementen, 15 - 16 essentiellen Aminosäuren und 7 - 8 Vitaminen (Dulbecco & Freeman 1959; Smith *et al.* 1960) enthält das Medium den pH-Indikator Phenolrot, welcher zwischen pH 6.4 bis 8.2 einen Farbumschlag von Gelb nach Rotviolett zeigt.

Die stabile HEK293-CrChR2-Zelllinie wurde als Monolayer in Tet-On-Medium (Tabelle 23) kultiviert. Das Antibiotikum Puromycin diente der Aufrechterhaltung der

genomischen Insertion des *C*ChR2-Gens und Genecitindisulfat (G418, Stammlösung: 50 mg/mL in ddH₂O, Gibco, Thermo Fisher Scientific) der Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen (HEK293-Tet-On-Zellen sind G418 resistent).

Für die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin (azF, Bachem Holding) in ChRs wurde die unnatürliche Aminosäure in DMEM mittels Ultraschall (Sonorex RK 100, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG) gelöst. Nach vollständiger Solvatisierung wurde das Medium mit FKS komplettiert.

Zur Suspensionsadaptierung wurden speziell für diesen Zweck designierte Medien verwendet, u.a. EX-CELL293, FreeStyle293 und RPMI1640 (Tabelle 23). Die serumfreien Medien wurden, wenn nicht bereits vorhanden, mit „stabilem“ L-Glutamin (Dipeptid L-Ala-L-Gln) (Christie & Butler 1994) supplementiert, um die Desaminierung unter Bildung von freiem Ammoniak zu reduzieren, welches normalerweise von Bestandteilen des Kälberserums absorbiert wird (Schneider *et al.* 1996).

Alle Medien wurden vor Verwendung sterilfiltriert (Stericup, Durapore, 0.22 µm, Merck KGaA).

Tabelle 23: Medien für die Kultivierung von tierischen Säugerzellen. RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

Medium	Spezifikation / Rezeptur	Verwendungszeck	Hersteller
DMEM	4 mM „stabiles Glutamin“ (L-Ala-L-Gln), 3.7 g/L NaHCO ₃ , 4.5 g/L D-Glucose	HEK293/T, COS-1, CHO-K1, alle adhärierend, verwendet in der AG Hegemann (HU Berlin)	Biochrom GmbH / Merck KGaA
DMEM	1x GlutaMax, 4.5 g/L D-Glucose	HEK293T, verwendet in der AG Sakmar (Rockefeller University)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Gefriermedium	DMEM inkl. 20 % (v/v) FKS & 10 % (v/v) DMSO	Einfrieren von Zellen	Selbst angefertigt
Tet-On	Vollmedium inkl. 100 µg/mL G418 & 1.5 µg/mL Puromycin	HEK293-Tet-On- <i>C</i> ChR2-Zelllinie (adhärierend)	Selbst angefertigt
Vollmedium	DMEM inkl. 10 % (v/v) FKS	HEK293/T, COS-1, CHO-K1, alle adhärierend	Selbst angefertigt
Vollmedium inkl. azF	Vollmedium inkl. 1 mM azF	SCS in HEK293T (adhärierend)	Selbst angefertigt
EX-CELL 293	4 mM L-Ala-L-Gln, 6 g/L Glucose	Suspensionswachstum von HEK293	SAFC Bioscience / Merck KGaA
FreeStyle293	1x GlutaMax	Suspensionswachstum von FreeStyle 293-F und suspensionsadaptierten Zellen	Thermo Fisher Scientific
RPMI1640		Suspensionswachstum	Biochrom GmbH

2.4.6 Reaktivierung von kryokonservierten Zellen

Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und in vorgewärmtes (37 °C) Vollmedium überführt. Nach schonender Homogenisierung wurden die Zellen abzentrifugiert

(3 min, 500 rpm, RT) und der flüssige Überstand abgezogen, um das zur Kryokonservierung eingesetzte, aber zelltoxische DMSO möglichst weitestgehend zu entfernen. Pelletierte Zellen wurden anschließend in frischem Vollmedium resuspendiert und in einem entsprechenden Kulturgefäß im Brutschrank platziert. Um residuales DMSO zu beseitigen, erfolgte am folgenden Tag ein erneuter Wechsel des Mediums. Unter regelmäßiger Beobachtung und eventueller Vitalitätsprüfung (*cf.* Kapitel 2.4.8) erfolgte die Passagierung bei konfluenter Wachstumsfläche (*cf.* Kapitel 2.4.10).

2.4.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellpopulation wurde entweder manuell mit einem Hämacytometer (Neubauerzählkammer, Brand GmbH & Co. KG) oder automatisch mit einem Luna Automated Cell Counter (Logos Biosystems) bzw. Cellometer Vision Trio (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA) durchgeführt. Alle Methoden lieferten nur zuverlässige Ergebnisse nach Zellvereinzelung durch Trypsin-EDTA oder Einwirkung von mechanischen Scherkräften (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.). Für die manuelle Zellzahlbestimmung wurden wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension (in Dulbeccos Phosphatgepufferter Salzlösung, DPBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ & 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4, Biochrom GmbH) in das Hämacytometer appliziert und die Zellzahl in mindestens zwei der vier großen Eckquadrate bestimmt. Die Werte wurden gemittelt und mit einem Faktor von 10.000 (Volumen Kammer: 0.1 µL) multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter Suspension zu erhalten. In den meisten Fällen wurde eine zweite Messung derselben Probe angeschlossen (Doppelbestimmung).

2.4.8 Vitalitätsprüfung

Ein Aliquot von 200 µL Zellsuspension in DPBS (Biochrom GmbH) wurde mit 200 µL Trypanblau (0.4 % (w/v), Gibco, Thermo Fisher Scientific) durchmischt und für 2 min bei RT inkubiert. In einer Neubauerzählkammer wurde der Anteil an toten Zellen (tiefblau) im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Zellen bestimmt.

2.4.9 Mycoplasmen-Test

Stammkulturen wurden regelmäßig auf Mycoplasmen untersucht. Dazu wurde sich einem kommerziell erhältlichen Kit (Venor GeM Mycoplasma Detection Kit, Sigma-Aldrich) bedient. Es wurde sich nach den Herstellerangaben gerichtet. Jedoch war es essentiell, die dreiprozentigen Agarosegele mit Ethidiumbromid anzufärben, da die kleinen DNA-Fragmente (200 - 300 bp), wenn mit SYBR Green angefärbt, schnell zum Ausbleichen tendierten.

2.4.10 Kultivierung und Passagierung von adhärierenden Zellen

HEK293, HEK293T, HEK293-Tet-On, COS-1 und CHO-K1 wachsen in serumhaltigem Vollmedium als Monolayer-Kulturen und haften sich dabei an das entsprechende Substrat (Kulturgefäß) an. Es wurden optomechanisch behandelte Zellkulturflaschen (T75, 75 cm² Wachstumsfläche, TPP) bzw. -schalen (10 cm Durchmesser, 55 cm² Wachstumsfläche, Corning, Sigma-Aldrich) mit verbesserten Adhäsionseigenschaften verwendet. COS-1-Zellen wurden teilweise auch in Rollerflaschen (850 cm² Wachstumsfläche, Cellmaster, Greiner Bio-One) propagiert.

Zur Passagierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 3 - 5 mL DPBS (pH 7.4, Biochrom GmbH) pro Kulturgefäß gespült und durch fünfminütige Behandlung mit 0.2 - 0.5 mL 10x Trypsin/EDTA-Lösung (0.5 % (w/v) / 0.2 % (w/v), Biochrom GmbH) oder mit 0.5 mL TrypLE (Gibco, Thermo Fisher Scientific) im Inkubator von der Oberfläche abgelöst. Bei Zugabe von frischem Vollmedium wird Trypsin bzw. das Surrogat inaktiviert und die Zellen können durch Pipettieren vereinzelt werden. Die Zellzahl wurde im Anschluss manuell mittels Hämacytometer (Neubauerzählkammer, Brand GmbH & Co. KG) oder mithilfe eines Luna Automated Cell Counters (Logos Biosystems) bestimmt (*cf.* Kapitel 2.4.7). Für die Kultivierung der Stammkultur wurden 1.5 - 2x10⁶ Zellen / 8 - 10 mL Vollmedium in ein steriles Zellkulturgefäß überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank vermehrt. Dieser Prozess wurde in einem Rhythmus von 3 - 4 Tagen wiederholt und die Passagennummer fortgeführt.

2.4.11 Kultivierung von Suspensionszellen

Die kommerziell erworbenen FreeStyle 293-F Zellen (Thermo Fisher Scientific) wurden in FreeStyle 293 Medium (Thermo Fisher Scientific) bei 135 rpm vermehrt und bei Erreichen einer Zelldichte von 2 - 3x10⁶ Zellen/mL umgesetzt (alle 3 - 4 Tage). Um eine Dichte von 1 - 2x10⁵ Zellen/mL in der neuen Passage zu erreichen, wurde die benötigte Menge Zellsuspension mit frischem vorgewärmten Medium auf ein Gesamtvolumen von 30 mL verdünnt und in einen sterilen 125 mL Plastikerlmeyerkolben überführt. Die Passagennummer wurde notiert.

2.4.12 Suspensionsadaptation

Um die Biomasse zu vergrößern bzw. das Upscaling zu erleichtern, wurde versucht die stabil transfigurierte CrChR2-HEK293-Tet-On-Zelllinie an Suspensionswachstum zu adaptieren. In Anlehnung an van der Valk *et al.* und Herstellerangaben (SAFC Bioscience) erfolgte die Adaptation über 4 - 8 Passagen, wobei die FKS-Konzentration graduell verringert wurde (van der Valk *et al.* 2010).

Drei speziell für die Suspensionskultivierung prädestinierte serumfreie Medien (EX-CELL 293, FreeStyle293 & RPMI1640) standen zur Verfügung und wurden entsprechend der folgenden fünf Protokolle eingesetzt:

- 1) Direkte Adaptation an serumfreies Medium
- 2) Adaptation durch stufenweise Reduktion von Serum in serumfreiem Medium
- 3) Sequentielle Adaptation durch Mischungen aus serumhaltigem und -freiem Medium
- 4) Adaptation durch Mischungen aus konditioniertem und serumfreiem Medium
- 5) Adhärente Kultivierung in serumfreiem Medium und anschließende Überführung in Schüttelkulturen (*inside*-Adaptation)

Morphologie (Lichtmikroskop Telaval 31, Carl Zeiss), Zellpopulation (Hämacytometer oder OD₆₀₀, cf. Kapitel 2.4.7) und Vitalität (Trypanblau-Färbung, cf. Kapitel 2.4.8) wurden dokumentiert und überwacht. Der pH-Wert wurde entweder mittels internem pH-Indikator (Phenolrot) oder bei Nichtvorhandensein eines solchen (EX-CELL 293- und FreeStyle293-Medium) durch externe Messungen (pH-Meter 761, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG) kontrolliert und in einem physiologischen Bereich zwischen pH 7.0 bis 7.4 aufrechterhalten, ggf. durch Zusatz von frischem Medium. Verklumpungen und große Zellaggregate wurden ggf. mit Trypsin-EDTA behandelt, gevortext oder nach Sedimentation abgetrennt. Der Glukosegehalt der Medien, z.B. 6 g/L (EX-CELL 293) und 4.5 g/L (DMEM), wurde mittels Teststreifen (Medi-Test, Macherey-Nagel) überprüft und bei Unterschreiten einer Konzentration von 0.5 - 1.0 g/L das Medium gewechselt.

Direkte Adaptation an serumfreies Medium

Dieses Protokoll ist analog Herstellerangaben (EX-CELL 293, SAFC Bioscience). Adhärierende CrChR2-HEK293-Tet-On-Zellen wurden mittels Trypsin-EDTA von der Wachstumsfläche abgelöst und in Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (500 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in EX-CELL 293-Medium inkl. 6 mM stabilem L-Glutamin mit einer Dichte von 6×10^5 Zellen/mL aufgenommen. 20 mL Kulturen wurden in autoklavierten 100 mL Glaserlmeierkolben (Schott AG) transferiert und auf einem Mikrotiterplattenschüttler (100 - 120 rpm, MTS4, IKA Werke GmbH & Co. KG) im Brutschrank inkubiert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/mL wurden ausschließlich vereinzelte und vitale Zellen in frisches Medium (6×10^5 Zellen/mL) überführt und weiter kultiviert. Dieses Prozedere wurde für 2 - 6 Passagen wiederholt. Der Adaptationsprozess wurde als vollendet betrachtet, sobald die Vitalität über 95 % gestiegen war, sich die Generationszeiten (20 - 25 h) normalisiert hatten und primär einzelliges Wachstum zu verzeichnen war.

Adaptation durch stufenweise Reduktion von Serum in serumfreiem Medium

Die Serumentwöhnung erfolgte in fünf Stufen nach Van der Valk *et al.* (van der Valk *et al.* 2010). Dabei wurde der FKS-Gehalt sukzessive von 10 auf 0 % (v/v) reduziert. In der ersten

Passage wurden abtrypsinierte Zellen in serumfreiem Medium (EX-CELL 293, FreeStyle293 bzw. RPMI1640) inkl. 10 % (v/v) FKS resuspendiert ($0.5 - 1 \times 10^6$ Zellen/mL). Die Propagation erfolgte unter kontinuierlicher Homogenisierung (100 - 120 rpm) im Inkubator bis zu einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/mL. Anschließend wurden nicht aggregierte Zellen in frisches serumfreies Medium inkl. 5 % (v/v) FKS überführt ($0.5 - 1 \times 10^6$ Zellen/mL) und weiter kultiviert. In den nächsten beiden Passagen betrug die FKS-Supplementation nur noch 1 bzw. 0.1 % (v/v), wobei in der letzten Passage vollends auf FKS verzichtet wurde.

Sequentielle Adaptation durch Mischungen aus serumbaltigem und -freiem Medium

Beim hiesigen Protokoll nach van der Valk *et al.* erfolgte die Adaptation in vier Passagen:

- 0) Kultivierung in 100 % Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS als adhärierende Zellen
- 1) Kultivierung in 75 % Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS und 25 % serumfreiem Medium (SFM) in Suspension
- 2) Kultivierung in 50 % Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS und 50 % SFM in Suspension
- 3) Kultivierung in 25 % Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS und 75 % SFM in Suspension
- 4) Kultivierung in 100 % SFM in Suspension

Es wurden alle drei zur Verfügung stehenden Medien (*cf.* Tabelle 23) verwendet. Zelldichten und Passagierrhythmus waren analog der übrigen Protokolle.

Adaptation durch Mischungen aus konditioniertem und serumfreiem Medium

In Analogie zu van der Valk *et al.* wurden die Zellen innerhalb von vier Schritten entwöhnt:

- 0) Kultivierung in 100 % Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS als adhärierende Zellen
- 1) Kultivierung in 50 % „altem“ konditionierten Tet-On-Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS und 50 % SFM in Suspension
- 2) Kultivierung in 50 % konditionierten Medium aus Passage 1 und 50 % SFM in Suspension
- 3) Kultivierung in 25 % konditionierten Medium aus Passage 2 und 75 % SFM in Suspension
- 4) Kultivierung in 100 % SFM in Suspension

Es wurden die drei zur Verfügung stehenden Medien (*cf.* Tabelle 23) verwendet. Zelldichten und Passagierrhythmus waren analog der übrigen Protokolle.

Adhärente Kultivierung in serumfreiem Medium und anschließende Überführung in Schüttelkultur (inside-Adaptation)

Protokoll ist adaptiert aus van der Valk *et al.* und beinhaltet zwei Passagierungsschritte.

- 0) Kultivierung in 100 % Tet-On Vollmedium inkl. 10 % (v/v) FKS als adhärierende Zellen bis zur Konfluenz
- 1) Kultivierung in 100 % SFM inkl. $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12 mg/L, Carl Roth) als adhärierende Zellen bis zur Konfluenz
- 2) Kultivierung in 100 % SFM in Suspension, ausgesäte Zelldichte: $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/mL

Dieses Adaptationsprotokoll wurde nur mit EX-CELL 293-Medium durchgeführt. Calcium-Ionen unterstützen die Adhäsion an den Wachstumsflächen in der Abwesenheit von Serum. Verwendete Zelldichten für die Aussaat waren bis auf den letzten Schritt analog zu den oben genannten Protokollen.

2.4.13 Vorbereitung zur Kryokonservierung von tierischen Zellen

Zellen eines konfluenten Kulturgefäßes (20 - 25x10⁶ Zellen) wurden trypsinisiert und in 5 mL Vollmedium resuspendiert. Die lösliche Phase wurde mittels Zentrifugation (3 min, 500 rpm, RT) abgetrennt und verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 1 mL Gefriermedium (DMEM inkl. 20 % (v/v) FKS & 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Sarstedt AG & Co.) überführt, welches in einem für diesen Zweck designierten Schaumstoffbehälter (CoolCell LX, BioCision) platziert wurde. Dieser gewährleistet eine optimale Abkühlung von 1 °C/min in einem -80 °C Tiefkühler.

2.4.14 Expression in stabil transfizierter HEK293-Zelllinie

24 - 30 h vor Induktion wurde eine entsprechende Anzahl an CrChR2-HEK293-Tet-On-Zellen in Vollmedium auf sterilen Kulturgefäßen (T75, 75 cm² Wachstumsfläche, TPP) ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 - 90 % wurde das alte Medium abgezogen und mit 15 mL Induktionsmedium (Tet-On-Medium inkl. 50 - 500 ng/mL Doxycyclin (Stammlösung: 10 mg/mL in ddH₂O) & 5 µM Retinal (Stammlösung: 1 - 30 mM in Isopropanol oder Ethanol, Sigma-Aldrich)) überschichtet. Die induzierten Zellen wurden für weitere 48 - 72 h bei 37 °C kultiviert. In manchen Fällen wurde zusätzlich 2.5 h post-induktional der Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure (VPS, 4 mM, Stammlösung: 0.4 M in ddH₂O, Sigma-Aldrich) zugesetzt. Vor der Ernte wurde das alte Medium entfernt und der Zellmonolayer vorsichtig mit DPBS gewaschen. Durch anschließende Inkubation in DPBS inkl. 1 mM Na₂EDTA · 2 H₂O (Stammlösung: 0.25 M in ddH₂O, Fluka) und Proteaseinhibitor-Cocktail (PI) (cOmplete, EDTA-free, F. Hoffmann-La Roche AG) für 5 min im Brutschrank (37 °C) wurden die Zellen abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 500 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen erneut mit PI-haltigem DPBS gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet zur Rekonstitution in DPBS inkl. PI und 20 µM all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich) resuspendiert und im Dunkeln auf einem Nutator (10:20 rpm (*rotate:rock*), Enviro-Genie SI-1202, Scientific Industries Inc.) für 1.5 h bei 4 °C inkubiert. Vor Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Kryokonservierung bei -80 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation von der wässrigen Phase getrennt.

2.4.15 Immunoaffinitätschromatographie

1D4-Antikörper

Der zur Aufreinigung verwendete 1D4-Antikörper (Immunoglobulin G, IgG, $M_w \sim 150$ kDa) erkennt hochspezifisch die letzten 18 AS des C-Terminus von bovinem Rhodopsin als Epitop (Molday & MacKenzie 1983). Der Antikörper wurde von Prof. Thomas P. Sakmar (Rockefeller University, New York City, USA) zur Verfügung gestellt. Die Expression aus der Hybridomazelllinie und nachfolgende Aufreinigung erfolgte in seinen Laboratorien durch seine Mitarbeiter. Die Hybridomazelllinie wurde durch die Fusionierung von Mausmyelomazellen mit Mausmilzzellen generiert, welche mit gebleichten Membranen der äußeren Stäbchensegmente (ROS, engl. *rod outer segment*) von Rinderretina immunisiert wurde (Molday & MacKenzie 1983). Die Zelllinie wurde in serumfreiem Medium als Suspensionskultur in einem Bioreaktor (FiberCell Systems Inc., New Market, MD, USA) kultiviert und der sekretierte Antikörper mittels Immunoaffinitätschromatographie (Protein G) aufgereinigt.

Kopplung 1D4-Antikörper an Trägermaterial

Zur Herstellung des 1D4-Antikörper-Säulenmaterials wurde entweder das Trägermaterial selbständig mit Bromcyan (CNBr) aktiviert und anschließend mit dem Antikörper gekoppelt (Version 1) oder es wurde bereits CNBr-aktivierte Sepharose bezogen und nur der Kopplungsschritt im Labor durchgeführt (Version 2).

Version 1: Antikörperkopplung inklusive Aktivierung des Trägermaterials

Zu Beginn wurden alle benötigten Puffer und Lösungen angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Ein entsprechendes Volumen einer 1D4-Antikörper-Lösung (gesamt: 50 mg) wurde zu gleichen Teilen in zwei Konzentratoren (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, MWCO = 10 kDa, Merck KGaA) transferiert und auf 1 mL konzentriert (4 krpm, 4 °C). Die Lösung wurde mit Kopplungspuffer (10 mM Borsäure, pH 8.2, 150 mM NaCl, beides Sigma-Aldrich) auf ein Volumen von 15 mL eingestellt und konzentriert (~ 30 min, 4 °C, finales Vol. ~1.5 - 2 mL). Es erfolgte die erneute Zugabe von Kopplungspuffer und anschließende Konzentration. Beide Konzentrate wurden vereinigt und das Volumen gemessen. Die Konzentration (c_{280}) wurde spektroskopisch bestimmt und mit einem Immunglobulin G-spezifischen Korrekturfaktor ($c_{280}/1.35$) korrigiert.

25 mL Sepharose 2B (abhängig je nach Charge, z.B. 100 mL Sepharose in 138 mL Suspension, Sigma-Aldrich) wurde sechsmal mit ddH₂O gewaschen. Dazu wurde die Suspension in einen 50 mL Falcon (TPP) überführt und auf 50 mL mit ddH₂O aufgefüllt. Das Säulenmaterial wurde mittels Zentrifugation (4 krpm, 4 °C) pelletiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Um den Verlust von Säulenmaterial zu vermeiden, da es sehr leicht aufgewirbelt wird, sollte ein Überstand von ca. 2 mL bestehen bleiben. Anschließend wurde das Trägermaterial zweimal mit Natriumbikarbonat-Puffer (1 M NaHCO₃ pH 11, eingestellt mit 10 M NaOH) in analoger Weise gewaschen. Die Sepharose wurde mit einem gleichen Volumenanteil an Natriumbikarbonat-Puffer gemischt und auf Eis auf 4 °C gekühlt.

Die nachfolgende Aktivierungsreaktion wurde unter dem Laborabzug durchgeführt. Eine große Kristallisationsschale wurde mit Eis gefüllt und in der Mitte ein 100 mL Becherglas platziert, welches mit einem mittelgroßen Rührfisch und der kalten Sepharose-Suspension bestückt wurde. Die Temperatur und der pH-Wert wurden mittels Thermometer und pH-Meter (pH-Meter 713, Metrohm AG; Elektrode: SenTix 81, WTW / Xylem Analytics Germany GmbH & Co. KG) überwacht. Die Suspension wurde langsam gerührt. 2.55 g CNBr (Sigma-Aldrich) wurden unter dem Laborabzug in 2 - 3 mL Acetonitril (Carl Roth) gelöst und zum Säulenmaterial gegeben. Die Reaktion wurde für weitere 30 - 45 min unter Rühren auf Eis fortgesetzt. Da als Nebenprodukt Bromsäure entsteht, muss der pH mit der Zugabe von 10 M NaOH (ca. 10 - 12 mL) auf einem Wert von 11 gehalten werden. Die Reaktion wurde als beendet betrachtet, sobald keine pH-Wert-Änderungen mehr zu verzeichnen waren.

In einer Saugflasche wurden 100 mL $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (100 mM in dH_2O , Sigma-Aldrich) vorgelegt und der Reaktionsansatz über einen Büchnertrichter getrennt. Überschüssiges CNBr wurde durch die Eisenlösung inaktiviert (Entstehung von Berliner Blau, $\text{Fe}_4[\text{Fe(CN)}_6]_3$). Die gelartige Masse wurde viermal mit 50 mL eiskaltem ddH_2O gewaschen und zwischen jedem Schritt durch den Luftstrom getrocknet. Anschließend wurde noch zweimal mit 50 mL Kopplungspuffer gewaschen. Das Trägermaterial wurde in einen 50 mL Falcon überführt und in Kopplungspuffer resuspendiert. Das exakte Volumen der aktivierten Sepharose wurde nach einem Zentrifugationsschritt bestimmt. Es wurde eine 1:1 (w/v) Mischung aus Säulenmaterial und Kopplungspuffer hergestellt und mit der konzentrierten Antikörper-Lösung versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde im Anschluss zehnmal invertiert und über Nacht ($> 12 \text{ h}$) auf einem Nutator (10:20 rpm, Enviro-Genie SI-1202, Scientific Industries Inc.) bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Suspension auf zwei Falcons aufgeteilt und zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und spektroskopisch analysiert ($A_{280} \leq 0.05$). Das Säulenmaterial wurde mit dem 4 - 5fachen Volumen Deaktivierungspuffer (DPBS, pH 7.4 (Biochrom GmbH) incl. 10 mM Glycin (Carl Roth)) auf dem Nutator (10:20 rpm) für 1 - 2 h bei 4°C inkubiert. Dabei wurden die reaktiven Cyanatgruppen durch Glycin zum Isoharnstoff und/oder Imidocarbonat deaktiviert. Nach Abtrennung der löslichen Phase wurde das Säulenmaterial mit dem 4 - 5fachen Volumen DPBS gewaschen. Das fertige Säulenmaterial ($\sim 2 \text{ mg}$ Antikörper / mL Sepharose 2B) wurde als 1:1 (w/v) Mischung mit DPBS inkl. 10 mM NaN_3 (Sigma-Aldrich) bei 4°C gelagert.

Version 2: Antikörperkopplung an prä-aktiviertes Trägermaterial

Für die zweite Option wurden 30 mg 1D4-Antikörper (10 mg/mL in DPBS pH 7.4 incl. 10 % (v/v) Glycerol & 0.2 % (w/v) NaN_3) mit Kopplungspuffer (100 mM NaHCO_3 pH 8.3, 500 mM NaCl) auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. 1.5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) wurden in 1 mM HCl gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 30 mL aufgefüllt. Das gequollene Gel wurde 5 Mal mit jeweils 50 mL 1 mM HCl gewaschen, d.h. mehrfache Inversion des Reaktionsgefäßes über einen Zeitraum von 10 - 15 min und anschließende Zentrifugation (1 min, 3600 rpm, RT), wobei der lösliche Überstand verworfen

wurde. Danach wurde das Gel zweimal in analoger Art und Weise mit ca. 15 mL Kopplungspuffer gewaschen und mit der Antikörper-Lösung für 1 h auf dem Nutator (10:20 rpm) bei RT inkubiert (Bindung des Antikörpers an die aktivierte Sepharosematrix).

Nach der Phasentrennung mittels Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das pelletierte Säulenmaterial zweimal mit einem CV (Gelvolumen) Kopplungspuffer gewaschen, um den freien ungebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die feste Phase mit TRIS-Puffer (100 mM TRIS pH 8.0, Carl Roth) auf ein Volumen von 25 mL aufgefüllt und für 2 h auf dem Nutator (10:20 rpm) inkubiert (Absättigung der reaktiven Cyanatgruppen mit den Aminogruppen des TRIS). Es folgten fünf duale Waschräume mit jeweils 1 CV Natriumacetat-Puffer (100 mM Natriumacetat pH 4.0, 500 mM NaCl, Carl Roth) und 1 CV TRIS-NaCl-Puffer (100 mM TRIS pH 8.0, 500 mM NaCl, Carl Roth). Anschließend wurde das Gel zweimal mit BTP-Puffer (20 mM BTP pH 6.8, Sigma-Aldrich, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) gewaschen. Das pelletierte Säulenmaterial wurde mit 1 CV BTP-Puffer versetzt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.4.16 Aufreinigung aus stabil transfizierter HEK293-Zelllinie

Protokoll ist adaptiert von Starace *et al.* (Starace & Knox 1998) und wurde von Manija Kazmin (AG Sakmar, Rockefeller University, New York City, USA) modifiziert. Die gesamte Aufreinigung wurde unter dimmen Rotlicht durchgeführt. Mengenangaben beziehen sich auf die Expression aus einer T75-Kulturflasche (75 cm² Wachstumsfläche, TPP).

Geerntete CrChR2-HEK293-Tet-On-Zellen wurden in 1 mL Solubilisierungspuffer (50 mM TRIS pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 0.1 mM PMSF (alle vorherigen: Carl Roth) & 1 % (w/v) DDM (Glycon Biochemicals GmbH)) aufgenommen und für 2.5 h auf dem Nutator (10:20 rpm) bei 4 °C geschwenkt. Währenddessen wurden 50 - 100 µL der präparierten 1:1 (w/v) Mischung aus 1D4-Antikörper-Sepharose (~ 2 mg Antikörper/mL Sepharose) und DPBS (*cf.* Kapitel 2.4.15) innerhalb dreier Waschräume a 20 CVs auf Solubilisierungspuffer ohne DDM equilibriert. Unlösliche Zellfragmente und präzipitiertes Protein wurden mittels Zentrifugation (5 min, 16.1 krpm, 4 °C) abgeschieden und der Überstand mit dem Säulenmaterial für 12 - 20 h inkubiert. Anschließend wurde die feste Phase durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (30 s, 16.1 krpm, 4 °C) pelletiert und der Überstand verworfen. Das immobilisierte Protein wurde dreimal mit 1 mL Waschpuffer 1 (50 mM TRIS pH 6.8, 100 mM NaCl, 0.1 mM PMSF & 0.03 % (w/v) DDM) gewaschen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß nach Zugabe des Puffers mehrmals invertiert und die mobile Phase nach Zentrifugation (30 s, 2 krpm, 4 °C) abgetrennt. Dabei war erhöhte Vorsicht walten zu lassen, da das Säulenmaterial ziemlich flüchtig ist und schnell aufgewirbelt wurde. Als nächstes wurde mit 1 mL Waschpuffer 2 (66.6 mM NaH₂PO₄, 33.3 mM Na₂HPO₄ pH 6.5 (beide: Carl Roth), 0.1 mM PMSF & 0.03 % (w/v) DDM) genauso verfahren. Nach vollständiger Entfernung des wässrigen Überstands wurde die 1D4-Sepharose mit 100 - 160 µL Elutionspuffer (Waschpuffer 2 mit 0.18 mg/mL 1D5-Peptid (letzten 9 C-terminalen AS von bRho: TETSQVAPA, Synthese bei

GenScript)) versetzt und für 2 - 3 h auf dem Nutator (10:20 rpm, 4 °C) durchmischt. Im abschließenden Zentrifugationsschritt (15 min, 2 krpm, 4 °C) wurde das Eluat von der festen Phase separiert und in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Bestimmung der Proteinausbeute erfolgte spektroskopisch (Cary 300 Bio, Agilent Technologies) über die Chromophorabsorption ($\epsilon_{\text{Chrom}} = 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.4.17 Expression in COS-1

Das verwendete Transfektionsprotokoll ist adaptiert von Meyer *et al.* (Meyer *et al.* 2000). Die Expression in COS-1 erfolgte je nach Bedarf entweder in Kulturflaschen (75 cm² Wachstumsfläche, TPP) oder Rollerflaschen (850 cm² Wachstumsfläche, Cellmaster, Greiner Bio-One, 51 rpm), welche eine Konfluenz von 70 - 90 % aufwiesen. Die Transfektionsansätze wurden in Analogie zu Tabelle 24 pipettiert.

Tabelle 24: Transfektion von COS-1 mit DEAE-Dextran und Chloroquin. DEAE, Diethylaminoethyl; PenStrep, Kombilösung aus Penicillin (10.000 U/mL) und Streptomycin (10.000 µg/mL).

Reagenz	Kulturflasche (75 cm ²)	Rollerflasche (850 cm ²)	Finale Konz.
DNA	13.24 µg	150 µg	2.50 µg/mL
1 M TRIS pH 7.5	0.53 mL	6.0 mL	100 mM
Medium (DMEM incl. 1 % (v/v) PenStrep)	5.00 mL	48.0 mL	100 U/mL (Pen) 100 µg/mL (Strep)
DEAE-Dextran (2.5 mg/mL) in Medium	0.53 mL, 1.32 mg	6.0 mL, 15.0 mg	0.25 mg/mL
Σ	6.06 mL	60.0 mL	-
1 mM Chloroquindiphosphat in dH ₂ O	0.70 mL	7.5 mL	0.10 mM
Vollmedium (Medium inkl. 10 % (v/v) FKS)	6.00 mL	67.5 mL	-
Σ	6.70 mL	75.0 mL	-

Als erstes wurde die DNA in 100 mM TRIS-Puffer (pH 7.5, Carl Roth) gelöst, mit dem polykationischen Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE) (DNA:Dextran = 1:100 (w/w), Carl Roth) versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das alte Medium gegen frisches serumfreies Medium (DMEM incl. 1 % (v/v) PenStrep-Kombistammlösung: 10.000 U/mL (Pen) & 10.000 µg/mL (Strep), Biochrom GmbH) getauscht. Die DNA-Dextran-Komplex-Lösung wurde langsam auf das die Zellen überschichtende Medium getropft. Es folgte eine fünf- bis sechsstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Anschließend wurde der Transfektionsansatz abgenommen und die Zellen mit Vollmedium inkl. 0.1 mM Chloroquindiphosphat (Sigma-Aldrich) überschichtet (Tabelle 24). Nach Inkubation für 1 h im humiden Brutschrank wurde der Überstand entfernt und die Zellen zweimal mit Vollmedium (5 bzw. 50 mL für T75 bzw. Rollerflasche) gewaschen. Zur Expression wurden die

transfizierten Zellen in Vollmedium (15 bzw. 200 mL) inkl. 5 μ M all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich) für 48 - 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Entfernung des Expressionsmediums wurden die Zellen 1 - 2 Mal mit DPBS (10 bzw. 50 mL) gewaschen und nachfolgend entweder mechanisch (Zellschaber, Biochrom GmbH) oder mittels EDTA abgelöst. In beiden Fällen wurden die Zellen in DPBS incl. 1 mM Na₂EDTA · 2 H₂O und PI-Cocktail (cOmplete, EDTA-free, F. Hoffmann-La Roche) für mehrere Minuten im Inkubator gelagert. Die abgelösten Zellen wurde dann per Zentrifugation (5 min, 500 rpm, 4 °C) angereichert, mit DPBS gewaschen und mit dem Cofaktor (DPBS incl. PI & 20 μ M all-*trans*-Retinal) für 2 - 3 h bei 4 °C auf dem Nutator (10:20 rpm, 4 °C) rekonstituiert. Falls nicht direkt weiterverarbeitet, wurde das Zellpellet eingefroren (N₂(l)) und bei -80 °C gelagert.

2.4.18 Expression in HEK293/T und CHO-K1

Die Kultivierung der HEK293/T- und CHO-K1-Zellen erfolgte in Abwesenheit von PenStrep. Die verschiedenen Transfektionsprotokolle für adhärierende Zellen sind in Tabelle 25 verglichen.

Transfektion mit DEAE-Dextran und Chloroquin

Zellen wurden mit 13.24 μ g DNA / T75 analog der COS-1-Transfektion (*cf.* Tabelle 24) behandelt.

Transfektion mit FuGene HD

Zur Produktion größerer Mengen rekombinanten Proteins wurde das im vorherigen Abschnitt genannte Protokoll geringfügig modifiziert. Zellen wurden am Vortag entsprechend ausgesät, um zum Zeitpunkt der Transfektion 70 - 90 % Konfluenz der Wachstumsflächen zu erzielen. 13.24 μ g DNA (analog Expression aus COS-1 für T75) wurden mit 40 μ L FuGene HD (3 μ L/1 μ g DNA, Promega) in 1 mL DMEM für 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das alte Medium der Zellen abgenommen und gegen 5 mL DMEM incl. 5 μ M all-*trans*-Retinal getauscht. Der gesamte Transfektionsansatz wurde anschließend über die Zellen pipettiert und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das serumfreie Transfektionsmedium gegen Vollmedium inkl. 5 μ M all-*trans*-Retinal substituiert. 48 - 72 h nach Transfektion erfolgte die Zellernte und erneute Cofaktorrekstitution in Analogie zum COS-1-Protokoll (*cf.* Kapitel 2.4.17).

Transfektion mit Polyethylenimin

DMEM, DNA-Lösung und Polyethylenimin-Stammlösung (PEI) wurden aufgetaut und auf RT equilibriert. Für ein entsprechendes Kulturgefäß wurden jeweils 2.5 mL DMEM mit DNA-Lösung (13.24 - 25.5 μ g) bzw. 27 - 51 μ L PEI (1 mg/mL in ddH₂O, Polysciences Inc.) versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt (DNA:PEI = 1:2 (w/w)), kurz gevortext und für 30 - 45 min bei RT inkubiert, wobei die negativ

geladene DNA von dem kationischen Polymer komplexiert wird. Währenddessen wurde das alte Medium abgezogen und mit frischem vorgewärmtem DMEM (5 mL / T75) substituiert. Die DNA-PEI-Mischung wurde gleichmäßig auf den Zellen verteilt, welche im Anschluss für 8 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert wurden. Bevor die Zellen geerntet wurden, folgte ein Medienwechsel gegen Vollmedium incl. 5 - 10 µM all-*trans*-Retinal und weitere 48 h im Inkubator.

Transfektion mit Lipofectamine / - LTX und PLUS-Reagenz für UV-vis-Spektroskopie

Expression von wildtypischen Proteinen und deren konventionellen Mutanten

Das zugrunde liegende Protokoll ist angelehnt an Ye *et al.* (2008) und Naganathan *et al.* (2013) und bezieht sich auf die Expression aus einer 100 mm Kulturschale (55 cm² Wachstumsfläche, Corning, Sigma-Aldrich). Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 - 90 % wurde in zwei Reaktionsgefäßen jeweils 500 µL vorgewärmtes (37 °C) DMEM vorgelegt und entweder mit 3.5 µg DNA und 10 µL PLUS-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) oder mit 17 µL Lipofectamine / - LTX (Thermo Fisher Scientific) vermengt. Beide Ansätze wurden gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde im Anschluss auf die Zellen getropft, welchen vorher 7 mL frisches Vollmedium incl. 5 µM all-*trans*-Retinal zugesetzt wurde. Zellen wurden 36 - 48 h nach der Transfektion geerntet.

Für ReaChR und deren Mutanten wurde in den überwiegenden Fällen nur das Apoprotein exprimiert und in einem gesonderten Schritt, zumeist während der Solubilisierung (cf. Kapitel 2.4.22, Abbildung 27E & Abbildung 28E), mit Cofaktor rekonstituiert.

Expression von Kanalrhodopsin-Mutanten mit eingebauten unnatürlichen Aminosäuren

Da das nachfolgende Protokoll im größten Teil dem des vorherigen Abschnitts entspricht, sind nur die Unterschiede erwähnt. Bei der Expression von ChRs inklusive azF wurde 2 - 4 h vor der Transfektion das alte Medium abgezogen und gegen 7 mL Vollmedium incl. 1 mM azF (Bachem Holding) getauscht (cf. Kapitel 2.4.5). 2x 500 µL vorgewärmtes (37 °C) DMEM wurden in entsprechenden Reaktionsgefäßen vorgelegt. Das eine wurde mit DNA der drei Plasmide (pMT4_ChRTAG : pSVBpUC_tRNA_{CUA} : pcDNA3.1_aaRS_{azF}; cf. Tabelle 21 & Tabelle 22) in einem Mengenverhältnis von 1 : 1 : 0.1 (3.5 : 3.5 : 0.35 µg) und 10 µL PLUS-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) bestückt. Das andere wurde mit 17 µL Lipofectamine / - LTX (Thermo Fisher Scientific) supplementiert. Beide Komponenten wurden vermischt und für 5 - 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der komplette Transfektionsansatz gleichmäßig auf dem gesamten vorgelegten Medium verteilt. 24 - 48 h nach der Transfektion (je nach Farbe bzw. pH des Mediums) wurde das alte Medium gegen frisches Vollmedium incl. 1 mM azF getauscht. Die Ernte erfolgte 72 - 96 h post-transfektionell mittels Zellschaber.

Transfektion mit Lipofectamine / - LTX und PLUS-Reagenz für Elektrophysiologie und Fluoreszenzmikroskopie

1.0 - 2.0x10⁵ Zellen wurden in 2 mL Vollmedium incl. 1 mM azF und 1 µM all-*trans*-Retinal resuspendiert und für die Elektrophysiologie in eine Kulturschale

(d = 40 mm, 12.57 cm² Wachstumsfläche, TPP) bestückt mit 2 - 3 runden Glasdeckgläschen überführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden spezielle Kulturschälchen (d = 35 mm mit 14 mm Glaseinsatz, Poly-D-Lysin bezogen, MatTek Corporation) verwendet. Vor Transfektion wurden die Zellen mindestens 24 h im humiden Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) vermehrt.

Am Folgetag wurden die drei Plasmide (pCMV_ChR_{TAG}-mCerulean3 : pSVBpUC_tRNA_{CUA} : pcDNA3.1_aaRS_{azF} = 0.56 : 0.56 : 0.056 µg) in 100 µL vorgewärmtem DMEM gelöst und mit 1.6 µL PLUS-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) versehen. Zeitgleich wurden 2.72 µL Lipofectamine /-LTX (Thermo Fisher Scientific) in 100 µL vorgewärmtem DMEM gelöst. Es schloss sich eine sachte Vermengung beider Komponenten miteinander und eine Inkubation für 5 - 10 min bei RT an. Anschließend wurde der vereinte Ansatz zu den Zellen getropft. 24 - 48 h post-transfektionell erfolgten die elektrophysiologischen bzw. mikroskopischen Untersuchungen.

Für wildtypische Referenzmessungen (ChR-DNA ohne Amber-Stopp-Codon) wurde ebenfalls Suppressor-tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase im gleichen Mengenverhältnis wie für die azF-Mutanten kotransfiziert.

Transfektion mit TurboFect

Vor Beginn der Transfektion wurde das alte Medium der 70 - 90 % konfluenten Kulturgefäße abgezogen und gegen 10 mL frisches Vollmedium incl. 5 µM all-*trans*-Retinal getauscht. Nachfolgende Mengen beziehen sich auf eine 100 mm Kulturschale (55 cm² Wachstumsfläche, Corning, Sigma-Aldrich). In einem Reaktionsgefäß wurde 1 mL vorgewärmtes DMEM vorgelegt und anschließend mit 15 µg DNA und 30 µL TurboFect (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die Mischung wurde kurz gevortext, für 15 - 20 min bei RT inkubiert und auf die Zellen getropft. 36 - 48 h post-transfektionell wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und mechanisch geerntet (Zellschaber, Biochrom GmbH).

Für ReaChR und deren konventionelle Mutanten wurde nur das Apoprotein exprimiert und in einem gesonderten Schritt, zumeist während der Solubilisierung (*cf.* Kapitel 2.4.22, Abbildung 27E & Abbildung 28E) mit Cofaktor rekonstituiert.

Tabelle 25: Transfektionsmethoden. Die Mengen sind bezogen auf die Transfektion von adhären den Säugerzellen einer T75-Kulturflasche bzw. 100 mm Kulturschale mit 70 - 90 % Konfluenz.

	DEAE-Dextran	FuGene HD	Polyethylenimin (PEI)	Lipofectamine / - LTX	TurboFect
DNA-Menge	13.24 µg	13.24 µg	13.24 - 25.5 µg	3.5 µg	15 µg
Menge / Volumen	1.32 mg	40 µL	27 - 51 µg	17 µL	30 µL
Transfektionsreagenz				(+10 µL PLUS)	
Verhältnis DNA :	1:100 (w/w)	1:3 (w/v)	1:2 (w/w)	~1:5 (w/v)	1:2 (w/v)
Transfektionsreagenz					
Referenz	Meyer <i>et al.</i> , 2000	Promega	Sebastian Auer, MDC, Berlin	Ye <i>et al.</i> , 2008; Naganathan <i>et al.</i> , 2013	Thermo Fisher Scientific

2.4.19 Expression in FreeStyle 293-F

30 mL einer Zellsuspension der Dichte von 1×10^6 Zellen/mL wurde in einem sterilen Plastikerlmeyerkolben (125 mL) vorgelegt. In zwei Reaktionsgefäßen wurde jeweils 600 μ L optiPRO SFM-Medium (Thermo Fisher Scientific) pipettiert und entweder mit 37.5 μ g DNA oder mit 37.5 μ L des Transfektionsreagenzes FreeStyle MAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) vermengt. Beide Ansätze wurden gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde im Anschluss zu der Zellsuspension getropft. Zellen wurden unter kontinuierlichem Schütteln für 48 - 72 h inkubiert. 2.5 h post-transfektionell wurde all-*trans*-Retinal (5 μ M) zugesetzt. Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (500 rpm, 4 °C, 5 min), zweimal mit 5 mL DPBS inkl. PI-Cocktail (cComplete, F. Hoffmann-La Roche AG) gewaschen, ggf. eingefroren ($N_2(l)$) und bei -80 °C bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

2.4.20 Aufreinigung aus COS-1 und HEK293

Das Reinigungsprozedere ist angelehnt an das Protokoll für die stabile CrChR2-HEK293-Tet-On-Zelllinie (cf. Kapitel 2.4.16). Allerdings wurden die Pufferkomposition sowie der pH-Wert an die jeweilige Art der Affinitätschromatographie angepasst (Tabelle 26). Im Nachfolgenden sind nur die Abweichungen vom bereits beschriebenen 1D4-Protokoll erwähnt.

Tabelle 26: Puffer für die Aufreinigung aus COS-1 und HEK293. DDM wurde von Glycon Biochemicals GmbH und Desthiobiotin von IBA Lifesciences bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden über Carl Roth erworben.

Affinitätspeptid	Solubilisierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
1D4	50 mM TRIS pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 5 % (v/v) Glycerol & 2 % (w/v) DDM	Solubilisierungspuffer incl. 0.03 % (w/v) DDM	Waschpuffer incl. 0.25 - 0.36 mg/mL 1D5-Peptid
His ₁₀	50 mM TRIS pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 5 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) DDM & 25 mM Imidazol	Solubilisierungspuffer incl. 0.03 % (w/v) DDM & 50 mM Imidazol	Waschpuffer incl. 500 mM Imidazol
Strep-Tag II	100 mM TRIS pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O, 0.1 mM PMSF, 5 % (v/v) Glycerol & 2 % (w/v) DDM	Solubilisierungspuffer incl. 0.03 % (w/v) DDM	Waschpuffer incl. 2.5 mM Desthiobiotin

Bei Aufreinigung mittels Nickel-IMAC wurden 100 - 150 μ L Ni-NTA (Quiagen) / Zellen eines T75-Kulturgefäßes verwendet und vor Verwendung entsprechend in ddH₂O gewaschen und auf Solubilisierungspuffer ohne DDM, PMSF und Imidazol equilibriert. Das Protein wurde in zwei Phasen a 1 - 2 h mit jeweils 150 μ L Elutionspuffer eluiert.

Für die Isolation von Protein mit C-terminalem Strep-Tag II wurden Strep-Tactin Spin Columns (IBA Lifesciences) verwendet, welche vor Applikation der Proteinlösung mit 5 CVs Solubilisierungspuffer ohne DDM gewaschen wurden. Das solubilierte Protein wurde auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss 2 - 3 Mal erneut geladen. Anschließend wurde die

stationäre Phase mit 4 CVs Waschpuffer gewaschen und das immobilisierte Protein schlussendlich in Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Fraktionen wurden mit UV-vis-Absorptionsspektroskopie (Cary 300 Bio, Varian) und ggf. mit Western Blot analysiert, wobei positive Fraktionen vereinigt und konzentriert (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, MWCO = 50 kDa, Merck KGaA) wurden. Im Falle der Ni-IMAC wurde das Imidazol durch Dialyse entfernt.

2.4.21 Aufreinigung aus FreeStyle 293-F und HEK293T

Die Mengenangaben beziehen sich auf die Zellernte einer 100 mm Kulturschale (55 cm² Wachstumsfläche) bzw. 10x10⁶ FreeStyle 293-F-Zellen. Alle folgenden Präparationsschritte wurden unter dimmen Rotlicht absolviert. Zellen wurden in 1 mL Solubilisierungspuffer (DPBS pH 7.4 inkl. 1 % (w/v) DDM & 1x PI-Mix (cOmplete EDTA-free, F. Hoffmann-La Roche)) resuspendiert und für 2 - 5 h bei 4 °C auf dem Nutator (10:20 rpm) homogenisiert. Falls nur das Apoprotein exprimiert wurde, wurde es während der Solubilisierung rekonstituiert (Solubilisierungspuffer inkl. 10 µM *all-trans*-Retinal). Die lysierten Zellen wurde im Anschluss zentrifugiert (30 min, 60 krpm, 4 °C) und von unlöslichen Zelldebris und aggregiertem Protein getrennt. Zeitgleich wurden 75 - 150 µL der präparierten 1:1 (w/v) Mischung aus 1D4-Antikörper-Sepharose (~ 2 mg Antikörper/mL Sepharose) und DPBS (*cf.* Kapitel 2.4.15) dreimal mit 5 - 10 CVs DPBS gewaschen und *via* Zentrifugation (2 min, 4 krpm, 4 °C) wieder abgeschieden. Die wässrige Phase wurde bis auf einen kleinen residualen Rest zwischen jedem Schritt sehr vorsichtig abgezogen, da das Trägermaterial sehr leicht verwirbelt wird. Der klare Überstand des Zelllysats wurde zur equilibrierten festen Phase pipettiert und über Nacht (12 - 16 h) auf dem Nutator (10:20 rpm) bei 4 °C gebunden.

Am Folgetag wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 4 krpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die restliche Aufreinigung wurde im Kühlraum bei 4 °C unter Rotlicht durchgeführt. Dazu wurde das immobilisierte Protein in Waschpuffer (DPBS inkl. 0.03 % (w/v) DDM) aufgenommen und in eine entsprechende Anzahl an Filtereinheiten ($V_{\text{ges}} \leq 400 \mu\text{L}$, Ultrafree-MC-HV, 0.45 µm, Merck KGaA) transferiert. Das Säulenmaterial wurde per Zentrifugation (2 min, 5 krpm, 4 °C) pelletiert und ggf. das restliche Säulenmaterial in analoger Weise überführt. Es folgten fünf Waschschrte, d.h. das Säulenmaterial wurde für 10 - 15 min mit $\leq 500 \mu\text{L}$ Waschpuffer auf dem Nutator inkubiert und anschließend *via* Zentrifugation (2 min, 5 krpm, 4 °C) vom Durchfluss getrennt. Die Filtereinheiten wurden ggf. mit Parafilm (Bemis Company Inc.) abgedichtet.

Gebundenes Protein wurde in zwei bis drei Schritten mit Elutionspuffer (Waschpuffer inkl. 0.35 mg/mL 1D5 Peptid (TETSQVAPA, GenScript)) von der festen Phase eluiert. Dazu wurden jeweils 1 - 2 CVs Elutionspuffer auf das Säulenmaterial pipettiert und für 1 - 2 h auf dem Nutator inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2 min, 5 krpm, 4 °C), in welchem das Eluat in einem frischen Reaktionsgefäß (1.7 mL) gesammelt wurde. Abschließend wurde versucht, so viel Proteinlösung wie möglich in einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 13.2 krpm, 4 °C) anzureichern. Alle Fraktionen wurden vereinigt und ggf. konzentriert

(Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, MWCO = 50 kDa, Merck KGaA). Die Ausbeute wurde spektroskopisch bestimmt (Cary 300 Bio, Varian).

2.4.22 Chromophorrekonstitution von Apoprotein

Konzentrationsbestimmung der Cofaktor-Lösungen erfolgte über eine UV-vis-spektroskopische Messung der Chromophorabsorption mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($c = A/(\epsilon \cdot d)$; c , Konzentration in M; A , Absorbanz; ϵ , Extinktionskoeffizient in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; d , Schichtdicke in cm) sowie des spezifischen Extinktionskoeffizienten (Tabelle 27). UV-vis-Spektren von verschiedenen Lösungen beider prosthetischen Gruppen sind in Abbildung A 1 gezeigt.

Apoprotein wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Expression / Aufreinigung mit dem nativen Cofaktor all-*trans*-Retinal oder dem artifiziellen Analogon N-Oxid-Retinal rekonstituiert. Entweder erfolgte die Chromophorzugabe während der Expression (Teil des Nährmediums) oder erst nach der Ernte (Inkubation der Zellen in einer cofaktorhaltigen wässrigen Lösung). Alternativ wurden die Retinoide während der Solubilisierung bzw. der Affinitätschromatographie zugesetzt oder direkt zum aufgereinigten Protein pipettiert. Die Rekonstitutionseffizienz wurde über das Protein-zu-Chromophor-Verhältnis (A_{280}/A_{Chrom}) evaluiert.

Tabelle 27: Retinale.

Retinal	Stammkonz.	Finale Konz.	Hersteller / Bezugsquelle
all- <i>trans</i> -Retinal	1 - 30 mM in Ethanol oder Isopropanol (beides <i>p.a.</i>), $\epsilon_{380} = 42.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (in EtOH: Szuts & Harosi, 1991)	5 - 20 μM	Sigma-Aldrich
N-Oxid-Retinal	1.83 mM in Ethanol (<i>p.a.</i>), $\epsilon_{339} \sim 42.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	10 μM	Prof. Mordechai Sheves, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

2.5 Expression in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*

Expression und Aufreinigung von CrChR2-H134R, C1C2 (*cf.* Abbildung 25 & Abbildung 26) und ReaChR (*cf.* Abbildung 32I) wurde von Christina Schnick unter Anleitung von Dr. Katja Stehfest (beide AG Hegemann, HU Berlin) durchgeführt. Expression und Aufreinigung von CsChrimson wurde von Thi Bich Thao Nguyen unter Anleitung von Johannes Vierock (beide AG Hegemann, HU Berlin) durchgeführt (*cf.* Abbildung A 8B - D & Abbildung A 9). Expression und Aufreinigung des anionenleitenden ACR1 aus *Proteomonas sulcata* (PsACR1) wurde von Melanie Meiworm unter der Anleitung von Dr. Matthias Broser

(beide AG Hegemann, HU Berlin) durchgeführt (cf. Abbildung A 7). Das Prozedere ist beschrieben in Bamann *et al.* (2008); Bruun *et al.* (2011); Luck *et al.* (2012) und Hontani, Broser *et al.* (2017).

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Zellfraktionen erfolgte entweder mit dem DC Protein Assay-Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) oder mit dem Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) nach den Herstellerangaben. Dafür wurde eine Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin angefertigt und die behandelten Proben anschließend spektroskopisch (SpectraMax Microplate Reader, Molecular Devices LLC bzw. Infinite 200, Tecan Group AG) vermessen. Es erfolgten Mehrfachbestimmungen (2 - 3 Mal).

2.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurden entweder diskontinuierliche 15 % (v/v) Trenn- und 5 % (v/v) Sammelgele nach Laemmli (Laemmli 1970) hergestellt (AG Hegemann) oder kommerzielle Gradientengele (NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris, Thermo Fisher Scientific) bezogen (AG Sakmar).

Die einzelnen Chemikalien wurden von Carl Roth bezogen. Die radikalische Polymerisation des Trenngels (15 % (w/v) Acrylamid, 0.4 % (w/v) N,N' -Methylenbisacrylamid (Rotiphorese Gel 30, 37.5:1.0 Mischung aus beiden Komponenten), 373 mM TRIS pH 8.9 (Stammlösung: 1 M in ddH₂O), 0.1 % (w/v) Natriumlaurylsulfat (SDS, Stammlösung: 10 % (w/v) in ddH₂O) wurde mit dem Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS, 0.08 % (w/v), Stammlösung: 10 % (w/v) in ddH₂O) in Anwesenheit des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED, 0.08 % (v/v)) initiiert. Die Mischung wurde in eine abgedichtete Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

Nach vollständiger Polymerisation wurde der Alkohol abgezogen und mit dem Sammelgel (5 % (w/v) Acrylamid, 0.13 % (w/v) N,N' -Methylenbisacrylamid, 125 mM TRIS pH 6.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.05 % (w/v) APS, 0.1 % (v/v) TEMED) übergossen. Dabei wurde ein entsprechender Probenkamm eingesetzt. Die festen auspolymerisierten Gele wurden in einer Elektrophoresekammer fixiert und mit Anoden- und Kathodenpuffer (AG Hegemann: 191.8 mM Glycin, 24.8 mM TRIS pH 8.9, 0.1 % (w/v) SDS; AG Sakmar: 2.5 mM MES, 2.5 mM TRIS, 0.005 % (w/v) SDS, 0.05 mM Na₂EDTA · 2 H₂O, pH 7.3) bestückt. Die zu untersuchenden Proben wurden entweder mit selbst angefertigtem Probenauftragspuffer (58.3 mM TRIS pH 6.8, 5 % (v/v) Glycerol, 1.67 % (w/v) SDS, 1.67 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 4.17 % (w/v) Bromphenolblau) oder mit NuPAGE-Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) incl. 25 mM Dithiothreitol versetzt und in die Geltaschen geladen. Bis auf Ausnahmefälle wurde

von einer thermischen Behandlung (10 min, 90 °C) abgesehen. Zur Verifizierung der Größe der Fragmente wurde zusätzlich ein Proteinmarker geladen (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad Laboratories Inc.). Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt, solange bis die blaue Lauffront (Bromphenolblau) aus dem Gel migriert war (ca. 45 min). Anschließend wurde das Gel entweder mit einem Fluoreszenz-Scanner vermessen (bei Proteinmarkierung mit einem Fluorophor), mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt oder ungefärbt für einen Western Blot weiterverwendet.

Detektion von Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Scanner

Nach bio-orthogonaler Proteinmarkierung mit einem Alexa647-Fluorophor (cf. Abbildung 49D & Kapitel 2.12) wurden die aufgetrennten Proteinfractionen mit einem konfokalen Fluoreszenz-Scanner (Typhoon 9400, Laseranregung: 633 nm, Emissionsfilter: 670±15 nm, Spannung Photomultiplier: 600 V, GE Healthcare) analysiert. Für Dokumentationszwecke wurden Bilder mit einer Pixelgröße von 100 µm aufgenommen.

Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau

Das Trenngel wurde vom Sammelgel abgetrennt und 15 min in heißer (nicht kochender) Färbelösung (0.1 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250, 50 % (v/v) Ethanol (*p.a.*), 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Es folgten zwei zwanzigminütige Entfärbeschritte in Entfärbelösung (30 % (v/v) Ethanol (*p.a.*) bzw. 12.5 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Abschließend wurde das Gel für einige Minuten in ddH₂O gelagert bevor es zu Dokumentationszwecken getrocknet oder/und fotografiert wurde. Alle Chemikalien wurden bei Carl Roth erworben.

2.6.3 Western Blot nach Towbin

Die Detektion erfolgte entweder über eine kolorimetrische Farbentwicklung *via* Alkalischer Phosphatase (AP) (AG Hegemann) oder über fluoreszente Antikörper (AG Sakmar).

Kolorimetrische Detektion mittels Alkalischer Phosphatase

Das Protokoll ist angelehnt an Towbin *et al.* (1979). Entsprechend der Dimensionen des ungefärbten SDS-Trenngels wurde eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF, Immobilon-P Membran, Merck KGaA) zugeschnitten, mit Methanol für 15 s aktiviert und anschließend für 2 min in dH₂O und 5 min in Blottingpuffer (150 mM Glycin, 25 mM TRIS pH 8.5, 10 % (v/v) Methanol) inkubiert. Das Sammelgel des Polyacrylamidgels wurde entfernt und das verbleibende Trenngel möglichst luftblasenfrei auf der Membran platziert. Beide Lagen wurden zwischen zwei dicken (Gel-Blotting-Paper, Whatman, GE Healthcare) und zwei dünnen Filter-Papieren (Chromatographiepapier 3MM Chr, Whatman, GE Healthcare) in einer Semi-Dry-Blot-Kammer (Blue Flash M, Serva Electrophoresis GmbH) geschichtet. Der Transfer wurde mit einer Stromstärke von 2 - 2.5 mA/cm² Membran für ca. 45 - 60 min durchgeführt.

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte (bis auf die Detektion) wurden in selbstgebaute Hybridisiergefäßen unter gelindem Schütteln absolviert. Nach dem Transfer wurden die vakanten Membranregionen in Blockpuffer (PBS (136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O & 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) incl. 0.1 % (v/v) Tween 20 (PBS-T) & 5 % (w/v) Milchpuffer) für 1 h abgesättigt. Anschließend erfolgte die Bindung des entsprechenden primären Antikörpers (Tabelle 28) in PBS-T incl. 0.7 - 1 % (w/v) Milchpulver an die Epitope der immobilisierten Proteine über Nacht. Nichtgebundener Antikörper wurde innerhalb dreier Waschschrte a 10 min in PBS-T entfernt. Die PVDF-Membran wurde nachfolgend mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 28) in PBS-T für 1 h geblottet. Nach erneutem Waschen mit PBS-T (3x10 min) erfolgte die Entwicklung in Detektionspuffer (100 mM TRIS pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), welchem Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (60 µg/mL, Stammlösung: 75 mg/mL in 70 % (v/v) DMF, Fluka) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (150 µg/mL, Stammlösung: 50 mg/mL in DMF, Sigma-Aldrich) zugesetzt wurden. Bei ausreichender Signalstärke wurde die Bildung des blauen Indigo- und des roten Formazanfarbstoffes mit ddH₂O gestoppt. Die Membranen wurden im Dunklen aufbewahrt und zwecks Dokumentation gescannt und archiviert.

Detektion mittels infrarotfluoreszierender sekundärer Antikörper

Die PVDF-Membran (Immobilon-FL, Merck KGaA) wurde kurz (10 - 15 s) mit Methanol aktiviert und anschließend mitsamt den Filterpapieren (2x2) in Pierce Fast Semi-Dry Transferpuffer (Thermo Fisher Scientific) für 10 - 15 min unter gelindem Schütteln inkubiert. Nach Ende der PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel jeweils 10 min in ddH₂O und Transferpuffer equilibriert. Das Gel und die Membran wurden zwischen den equilibrierten Filterpapieren im Blotter (Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Fisher Scientific) assembliert. Eingeschlossene Luftblasen wurden vorab mittels eines Gelrollers entfernt. Der Transfer wurde bei 25 V für 7 - 10 min durchgeführt.

Im Anschluss wurde die Membran mit ddH₂O abgespült und in Blockingpuffer (TBS-T (20 mM TRIS pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) incl. 5 % (w/v) Milchpulver) für 1 h inkubiert. Nach Abgießen des Blockingpuffers erfolgte die Bindung des primären Antikörpers (Hybridoma 1D4-Antikörper, AG Sakmar, 1:5.000 in TBS-T incl. 5 % (w/v) Milchpulver) unter gelindem Schütteln über Nacht bei RT.

Nach dreimaligem Waschen (beinhaltet leichtes Schütteln) mit TBS-T für 10 min wurde der sekundäre Antikörper (*anti*-Maus IRDye 800CW, LI-COR Biosciences, 1:20.000 in TBS-T incl. 5 % (w/v) Milchpulver & 0.01 % (w/v) SDS) für 1 h appliziert. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBS-T und einem zusätzlichen mit TBS erfolgte die Detektion mit einem Fluoreszenz-Scanner (Odyssey Sa Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences) bei 700 und 800 nm.

Tabelle 28: Antikörper für Western Blot.

Antikörper	Konzentration	Finale Konzentration / Verdünnung	Bezugsquelle
Hybridoma 1D4 (primär)	0.97 mg / mL	1:1.000 - 5.000	Prof. Thomas P. Sakmar (Rockefeller University)
Maus <i>anti</i> -His (primär)	-	1:4.000	Sigma-Aldrich
<i>anti</i> -Maus IgG AP-Konjugat, aus Ziege, polyklonal (sekundär)	-	1:2.000 - 5.000	Sigma-Aldrich
<i>anti</i> -Maus IRDye 800CW aus Ziege (sekundär)	-	1:20.000	LI-COR Biosciences

2.7 UV-vis-Absorptionsspektroskopie

2.7.1 Belichtung

Bei Belichtungsexperimenten wurden Dreifenster-Küvetten (16.160-F/Q/10-Z15, Starna) verwendet. Die Anregung der isolierten Photorezeptoren vor bzw. während der Messungen erfolgte mit LEDs (Tabelle 29), welche orthogonal zum Strahlengang an der Küvettenkammer befestigt wurden. Bei Zweifarbenanregung wurde die zweite LED oberhalb der Küvette platziert. Ggf. wurde das emittierte Licht durch einen entsprechenden Bandpassfilter (BPF) geführt. Die Ansteuerung der LEDs erfolgte mit selbst gebauten Steuereinheiten (Dr. Robert Arndt, HU Berlin, meist: 500 mA). Die Lichtintensität wurde mit einem Powermeter (FieldMax II, Coherent Inc.) mit entsprechendem Messkopf (Power Max PM 10V1, Coherent Inc.) bestimmt.

Tabelle 29: LEDs. n.b., nicht bestimmt.

Farbe	$\lambda_{\text{Emission}}$ / nm	FWHM / nm	Spezifikation / Hersteller
UV	400	n.b.	Thorlabs
Cyan	505	n.b.	Thorlabs
Grün	530	35	Luxeon LXHL-NM98 Star/O, Philips
Bernstein	590	14	Luxeon LXHL-NL98 Star/O, Philips
Rot	625	20	Luxeon LXHL-ND94 Star/O, Philips

2.7.2 Stationäre UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Für stationäre UV-vis-Absorptionsspektroskopie wurde sich einem Cary 300 Bio Spektrophotometer (Varian / Agilent Technologies) bedient. Die Operation des Geräts erfolgte über die Herstellersoftware (Cary Scan, Varian). UV-vis-Spektren wurden in der

Zweistrahlskonfiguration inkl. Pufferreferenz mit zwei baugleichen Mikroküvetten (16.160-F/Q/10-Z15, Starna) mit einer spektralen Auflösung von 1 - 2 nm durchgeführt. Je nach optischer Dichte der Probe wurde eine spektrale Bandbreite (SBW, engl. *spectral bandwidth*) zwischen 2 und 4 nm gewählt. Vor der eigentlichen Messung wurde ein Pufferspektrum aufgezeichnet, welches von dem Probenspektrum automatisch subtrahiert wurde (Einstellung: Basislinien-Korrektur). Je nach Photorezeptor wurden Spektren zwischen 750 - 650 nm und 250 nm aufgezeichnet. Ggf. wurde die Wellenlänge des Lampenwechsels zwischen der Deuterium-Bogenlampe (D2, UV-Spektrum) und der Halogenlampe (Iod-Quarz, sichtbares Spektrum) geändert (Grundeinstellung: 350 nm). Die Küvettenkammer wurde mit einem Wasser-Thermostat (RM6, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG) auf 20 °C temperiert.

2.7.3 Kinetische UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Langsame spektrale Änderungen ($\tau \sim \text{s}$ bzw. min) bei einzelnen Wellenlängen wurden im Kinetik-Modus des Cary 300 Bio Spektrophotometer (Varian / Agilent Technologies) aufgezeichnet. Die Bedienung erfolgte über die Herstellssoftware (Cary Kinetics, Varian). Meistens wurde mit einer SBW von 4 nm gemessen. Für „schnelle“ kinetische Prozesse wurde eine kurze Integrationszeit (Minimum: 33 ms) gewählt. Um bei simultaner Belichtung das Streu- und Anregungslicht zu reduzieren, wurde vor dem Photomultiplier ein entsprechender BPF (FWHM = 10 nm, Thorlabs) platziert.

2.7.4 Kryostatische UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Die kryostatischen UV-vis-Differenzspektren (Licht minus Dunkel) aus Abbildung 43B wurden von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt und sind beschrieben in Krause *et al.* (2017). Die Küvettenkammer des Photospektrometers war in einem Kryostat (DN, Oxford Instruments) gelagert.

2.7.5 Transiente UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Messaufbau

Die Messvorrichtung basiert zum größten Teil auf einem kommerziell erhältlichen Blitzlicht-Photolyse-System (LKS60, Applied Photophysics Ltd). Das Messlicht (short arc XBO 150 W/CR OFR, OSRAM Licht AG) wird über eine Sammellinse auf die Mitte der Küvettenkammer fokussiert, an wesen Ende ein Lichtleiterkabel (UV-vis-Quarz Faserbündel mit 50 Fasern ($d = 100 - 125 \mu\text{m}$), numerische Apertur: 0.12, LOT-QuantumDesign GmbH) das transmittierte Licht über einen Spektrographen (Shamrock SR303-i, Andor Technology Ltd, Brennweite: 303 mm, Gitter: 3) an die ICCD-Kamera (engl. *intensified charge-coupled device*, iStar DH734, Andor Technology Ltd, 1024x1024 Pixel, 346 - 703.63 nm, spektrale Auflösung

~ 0.4 nm) transportiert. Für Zeitbereiche $< 1 \mu\text{s}$ nach Laseranregung wurde das Messlicht ggf. mit einem Pulser (100 V, ArcLamp Pulser 03-102, Applied Photophysics Ltd.) verstärkt. Die Länge des Messlichtpulses wurde mittels einer mechanischen Blende (Uniblitz LS6ZM2 und VCM-D1 (Steuereinheit), Vincent Associates) gesteuert.

Die rekombinanten Photorezeptoren wurden mit einem kurzen Laserpuls (~ 10 ns) angeregt, welcher über ein Umlenkprisma in einem spitzen Winkel ($< 90^\circ$) in Richtung der Küvette reflektiert wurde. Für die Anregung standen zwei Nd:YAG-Infrarot-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat, Brilliant und Brilliant B, Quantel) zur Verfügung. Die Fundamentale ($\lambda_{\text{Exz}} = 1064$ nm) wurde über einen Frequenzverdoppler (2ω , SHG, engl. *second harmonic generator*, Quantel) und -verdreifacher (3ω , THG, engl. *third harmonic generator*, Quantel) in Licht einer Wellenlänge von 532 nm (SHG) bzw. 355 nm (THG) umgewandelt. Beide Anteile wurden in einem optisch parametrischen Oszillator (OPO, Rainbow, MagicPrism, Opotek Inc.) gemischt und generierten je nach Einstellung Licht einer Wellenlänge zwischen 420 - 680 nm. Die Justage der exakten Anregungswellenlänge erfolgte entweder über eine Mikrometerschraube (Brilliant B) oder über die Opotek-Kontrollsoftware (Brilliant) und wurde mit der ICCD-Kamera verifiziert. Die emittierte Energie wurde mit einem Powermeter (FieldMax II inkl. Power Max PM 10V1, Coherent Inc.) gemessen.

Der zeitliche Ablauf wurde über drei Pulsgeneratoren (Generator 0: 9614, Quantum Composers Inc.; Generator 1 & 2: T560, Highland Technologies Inc.) geregelt.

Messablauf und Messprotokoll

Die Messungen erfolgten in einem klimatisierten Raum bei 20°C . Circa 1 h vor Beginn der Messung wurde die Apparatur, vor allem Messlicht und die Blitzlampen des Lasers, angeschaltet. Nach Justage der Anregungswellenlänge wurde die Energie des Lasers ermittelt und notiert. Eine Dreifensterküvette (16.160-F/Q/10-Z15, Starna, 1 cm) wurde mit Proteinlösung einer optischen Dichte von $A_{\text{Chrom}} = 0.3 - 1.0$ befüllt und mit einem Plastikdeckel und Parafilm verschlossen. Das Messprogramm („Hegs. Andor-Driver_040615“, geschrieben von Dr. Rolf Micha Hagedorn, ehemals AG Hegemann) wurde gestartet und die interne Kameraverstärkung (*gain*, Wert zw. 1 und 255) und die Blendenöffnungszeit (TTL) so gewählt, dass im spektralen Fenster bei keiner Wellenlänge > 65.000 Photonen detektiert wurden.

Im Messprogramm konnten folgende Einstellungen editiert werden: Anregungslaser (Brilliant oder Brilliant B), Verwendung des Pulsers im frühen Zeitbereich, Anzahl der Messzyklen (normalerweise: 10 - 20), Zeitbereich der Messung nach Laseranregung (normalerweise: 10 ns bis 10 s, 9 Dekaden), Messpunkte während des ausgewählten Zeitraums (normalerweise: 5 / Dekade, $\Sigma = 46$) und Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten (normalerweise: isologarithmisch). Zu jedem ausgewählten Zeitpunkt n wurde erst ein „Dunkelspektrum“ (detektierte Photonen ohne vorherige Laseranregung) und 5 - 10 s später das korrespondierende „Lichtspektrum“ (detektierte Photonen mit vorheriger Laseranregung zum Zeitpunkt $t = 0$). In Abhängigkeit der Photozyklus-Durchlaufzeit folgte eine Dunkelphase von 1 - 4 min bevor erneut ein „Dunkelspektrum“ sowie ein „Lichtspektrum“ zum Zeitpunkt $n+1$

gemessen wurde, d.h. z.B. eine Laseranregung alle 60+5 s bis 240+5 s (Belichtungsfrequenz: 4.08 - 15.38 mHz). Falls das zu untersuchende Protein während der Messung eine erhebliche Lichtadaptation oder/und Ausbleichen des Chromophors zeigte, wurden entweder die Kameraparameter (*gain* & *TTL*) so angepasst, dass die detektierte Photonenzahl wieder bei ≤ 65.000 Photonen lag oder frische Probe eingesetzt. Nach der Messung (10 - 20 h) wurde die Integrität des Proteins mittels stationärer UV-vis-Spektroskopie (Cary 300 Bio, Varian) überprüft.

Datenprozessierung

Die Datenprozessierung erfolgte mit MATLAB (The MathWorks Inc.), R (R Foundation for Statistical Computing) und Glotaran (Mullen & van Stokkum 2007; Snellenburg *et al.* 2012).

Die generierten Rohdaten (Protein.D: Photonenspektren; Protein.tt: Zeitpunkte; Protein.WL: Wellenlängen) wurden mit der MATLAB-Routine „DatenEinlesen“ (geschrieben von Dr. Rolf Micha Hagedorn, ehemals AG Hegemann) eingelesen und in *Sys*-Strukturen überführt. Anschließend wurden die gemessenen Dunkel- und Licht-Photonenspektren aller Zyklen mit „DatenBearbeiten“ (MATLAB-Routine, geschrieben von Dr. Rolf Micha Hagedorn) gemittelt und in Extinktionsspektren ($\text{Sys.E} = -\log_{10}(\text{Lichtspektren/Dunkelspektren})$) überführt. Spektren im frühen Zeitbereich ($t < 100$ ns nach Anregung), welche Laserartefakte zeigten (besonders bei CW-Messungen (engl. *continuous wave*) ohne Pulserverstärkung), wurden verworfen.

Für die globale Analyse der Daten mit Glotaran wurde die Datenstruktur entsprechend geändert (*time explicit*). Die Programmiersprache R wurde gestartet und initialisiert (Kommandos: „library(Rserve)“ & „Rserve()“). Anschließend wurde das Programm Glotaran gestartet und die Daten eingelesen. Mittels Singulärwertzerlegung (SVD, engl. *singular value decomposition*) des Datensatzes wurde die Anzahl an signifikanten Komponenten bestimmt, welche im Anschluss für die Rekonstruktion des Spektrensatzes (Funktion: „SVD Filter“, normalerweise: 2 - 3) verwendet wurde. Des Weiteren wurde über sechs Wellenlängeninkremente gemittelt (Funktion: „Average“; resultierend: 349 - 703.1 nm, Inkrement: 2.1 nm) um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

Der so prozessierte Datensatz wurde der globalen Analyse unterzogen. Als erstes wurde die Anzahl der kinetischen Komponenten und deren Geschwindigkeitskonstanten abgeschätzt. Es wurde ein sequentielles kinetisches Modell (ohne Rückreaktionen und mit steigenden Lebenszeiten der einzelnen Komponenten) mit 4 - 5 Komponenten zugrunde gelegt. Die Güte des Fits wurde anhand der SVD-rekonstruierten und gemittelten Daten evaluiert (quadratisches Mittel, engl. *root mean square*, $\text{RMS} \leq 0.0005$). Die resultierenden EADS (engl. *evolution associated difference spectra*) und deren Zeitkonstanten (häufig: Halbwertszeiten, $t_{1/2}$) sowie einzelne Wellenlängentransienten wurden extrahiert. Die Fehlerberechnung erfolgte mit Glotaran (Funktion: „Calculate errors“).

Für die Berechnung von absoluten Spektren der Photozyklusintermediate (*cf.* Abbildung 31F, Abbildung 38E & Abbildung A 9E, F) wurden die nichtnormierten EADS mit einem entsprechenden Anteil des korrespondierenden Dunkelspektrums addiert. Dafür wurden die

Wellenlängeninkremente der transienten Spektren mithilfe von Origin Pro auf 1 bzw. 2 nm (Inkrement der Dunkelspektren) interpoliert. Bei Annahme einer Anregung der Photorezeptoren durch den Laserpuls von 10 % waren keine negativen Absorptionswerte mehr zu beobachten.

2.8 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Proteinproben (in DPBS pH 7.4 inkl. 0.03 % (w/v) DDM) für die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) wurden in Konzentratoren (Amicon Ultra-0.5 mL Zentrifugen-Filtereinheiten, MWCO = 50 kDa, Merck KGaA) aufkonzentriert ($c_{\text{Chrom}} = 20 - 300 \mu\text{M}$ je nach Proteinausbeute). Für die *rapid-scan*-Messungen wurde die Proben in Niedrigsalz-PBS (15.55 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1.47 mM KH_2PO_4 & 0.03 % (w/v) DDM) equilibriert und anschließend konzentriert.

2.8.1 Photostationäre Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die photostationären FTIR-Messungen und deren Auswertung sowie der Wasserstoff-Deuterium-Austausch (H/D) wurde von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt. Die konzentrierten, rehydratisierten Proben wurden zwischen zwei BaF_2 -Fenstern aufgetragen und mit einem ifs66v/s FTIR-Spektrometer (Bruker) mit einem $\text{N}_2(\text{l})$ -gekühlten Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor (Kolmar Technologies) analysiert. Während für Messungen an ReaChR und konventionellen Mutanten ein 1850 cm^{-1} Sperrfilter (Spektrum: $\nu = 1850 - 900 \text{ cm}^{-1}$) verwendet wurde, wurde dieser bei Untersuchungen der Azidomutanten ausgebaut (Spektrum: $\nu = 3999 - 900 \text{ cm}^{-1}$). Spektren wurden mit einer Abtastrate von 200 kHz und einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Es wurden mindestens 2500 Spektren aufgenommen und gemittelt. Vermeintliche Basislinienkorrekturen erfolgten mit einem Spline-Algorithmus und der OPUS Software Version 6.5 (Bruker). Für Tieftemperaturmessungen wurde ein Kryostat (DN, Oxford Instruments) verwendet.

Der photostationäre Zustand (Belichtung: $\sim 530 \text{ nm}$ LED) wurde erreicht sobald die Absorption der prominenten Amid I-Schwingung bei $\sim 1660(-) \text{ cm}^{-1}$ ein stabiles Gleichgewicht erreicht hatte. Die verschiedenen FTIR-Differenzspektren wurden auf die Retinal-Bande normiert. H/D-Austausch erfolgte vor den Messungen durch wiederholten Pufferaustausch (DPBS, pH 7.8) und anschließende Konzentration (Centricon Filtereinheiten, GE Healthcare) über einen Zeitraum von mindestens drei Tagen. Die Basislinienkorrektur der Einzelkanalspektren (Dunkelspektren) der Azidomutanten erfolgte mit Origin Pro 8G (OriginLab Corporation) mit der implementierten Funktion „Impuls-Analyzer“ (8 - 12 manuell gewählte Punkte, Interpolationsmethode: B-Spline).

2.8.2 *Rapid-scan*-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die *rapid-scan*-Messungen inklusive der Auswertung wurde von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr-Universität Bochum) an einem Vertex 80V (Bruker) durchgeführt. Die Proben wurden mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (532 nm, 0.4 Hz, Minilite II, Continuum) angeregt. Die spektrale Auflösung lag bei 4 cm⁻¹. Es wurden mindestens 1000 Spektren gemittelt. Es wurde kein optischer Sperrfilter verwendet. Die Halbwertszeiten des Zerfalls der Amplitudenspektren wurde in Analogie zu Müller & Plesser (1991) ermittelt. Für weitere Details siehe Kuhne (2016).

2.8.3 *Step-scan*-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die *step-scan*-Messungen inklusive der Auswertung wurde von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr-Universität Bochum) an einem Vertex 80V (Bruker) durchgeführt. Laseranregung analog wie im vorherigen Abschnitt. Die spektrale Auflösung lag bei 8 cm⁻¹. Es wurden ≤ 100 Spektren gemittelt. Für weitere Details siehe Kuhne (2016).

2.8.4 Annäherung von Azido-FTIR-Differenzbanden

In der Stark-Spektroskopie werden die Proben inkl. eines Stark-Labels wie z.B. CN oder N₃ in Ab- (\mathcal{A}) und Anwesenheit eines elektrischen Feldes ($\mathcal{A}(F_{\text{ext}})$) vermessen und die Differenz ($\Delta\mathcal{A}(F)$) gebildet (Bublitz & Boxer 1997; Suydam & Boxer 2003; Fafarman & Boxer 2010). Die Auswertung der Stark-Spektren erlaubt die Einteilung der elektrochromen Änderungen in Polarisations- und Dipolmoments-Änderungen des entsprechenden Markers. $\Delta\mathcal{A}(F)$ lässt sich unter Annahme einer isotropen und immobilisierten Probe (meist in Form von gefrorenen Gläsern oder Polymer-Filmen) als Summe aus der gewichteten nullten, ersten und zweiten Ableitung des Spektrums ohne das externe Feld (\mathcal{A}) approximieren (Formel (1)). Die Gewichtung der einzelnen Ableitungen hängt von mehreren (experimentellen) Größen und Konstanten ab und wird durch drei Koeffizienten (\mathcal{A}_χ , B_χ & C_χ) ausgedrückt (Formeln (2) - (4)). So wird der Koeffizient der ersten Ableitung (B_χ) am Gesamtspektrum durch einen Polarisationsterm ($\Delta\alpha$) moduliert. Im Gegenzug hängt die Beteiligung der zweiten Ableitung (C_χ) hauptsächlich von Änderungen des Dipolmoments ($\Delta\mu^2$) ab (Bublitz & Boxer 1997; Andrews & Boxer 2000; Boxer 2009). Je nach dominierendem Effekt ($\Delta\alpha$ vs. $\Delta\mu$) besitzt $\Delta\mathcal{A}(F)$ eher die Form der ersten bzw. der zweiten Ableitung. Für weitere Details siehe Boxer (2009).

$$\Delta A(F, \chi) = f^2 F^2 \left\{ A_\chi \cdot A(\nu) + \frac{B_\chi}{15hc} \nu \frac{\partial}{\partial \nu} \left(\frac{A(\nu)}{\nu} \right) + \frac{C_\chi}{30h^2 c^2} \nu \frac{\partial^2}{\partial \nu^2} \left(\frac{A(\nu)}{\nu} \right) \right\} \quad (1)$$

$$A_\chi = \frac{1}{30m^2} \sum_{ij} [10A_{ij}^2 + (3 \cos^2 \chi - 1)(3A_{ii}A_{jj} + A_{ij}^2)] \\ + \frac{1}{15m^2} \sum_{ij} [10m_i B_{ijj} + (3 \cos^2 \chi - 1)(4m_i B_{ijj})] \quad (2)$$

$$B_\chi = \frac{5}{2} \text{Tr}(\Delta \alpha) + (3 \cos^2 \chi - 1) \left(\frac{3}{2} \Delta \alpha_m - \frac{1}{2} \text{Tr}(\Delta \alpha) \right) \\ + \frac{1}{m^2} \sum_{ij} [10m_i A_{ij} \Delta \mu_j + (3 \cos^2 \chi - 1)(3m_i A_{jj} \Delta \mu_i + m_i A_{ij} \Delta \mu_j)] \quad (3)$$

$$C_\chi = \Delta \mu^2 \cdot [5 + (3 \cos^2 \chi - 1)(3 \cos^2 \zeta - 1)] \quad (4)$$

F , appliziertes elektrisches Feld; m , Übergangsdipol; h , Planck'sches Wirkungsquantum; $\Delta \alpha_m = (m \cdot \Delta \alpha \cdot m)/m^2$; c , Lichtgeschwindigkeit; χ , experimenteller Winkel zwischen F_{ext} und der Polarisation des Feldes des Messlichts; ζ , fixierter Molekülwinkel zwischen $\Delta \mu$ und m ; f ist eine skalare Annäherung für einen Tensor (*local field corrections*). Formeln sind entnommen aus Boxer (2009).

Für die Modellierung des berechneten FTIR-Differenzspektrums von freiem azF (Wasser minus Isopropanol, cf. Abbildung 51F) wurde die erste und zweite Ableitung des Spektrums von freiem azF in Wasser aus Abbildung 51A mittels Origin Pro gebildet. Aufgrund der Kurvenform des Differenzspektrums wurden negative Polarisationsänderungen ($\Delta \alpha < 0$) angenommen und die erste Ableitung invertiert. Die „nullte Ableitung“ entspricht dem azF-Spektrum in Wasser. Die einzelnen Ableitungen wurden entsprechend gewichtet und zusammenaddiert. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt bis der bestmögliche Fit erzielt wurde.

Da die Ableitungen des ReaChR-Y110azF-Dunkelspektrums (cf. Abbildung 51D) stark verrauscht waren, wurde das FTIR-Doppeldifferenzspektrum (ReaChR-Y110azF minus WT, cf. Abbildung 51E) mit der Summe aus „nullter“, erster und zweiter Ableitung einer Gauß-Glockenkurve ($\nu_0 = 2108.8 \text{ cm}^{-1}$, FWHM = 15.4 cm^{-1}) angenähert (cf. Abbildung 51G). Die Gewichtung der einzelnen Komponenten erfolgte in analoger Weise wie für freies azF.

Für die Rekonstruktion eines vermeintlichen Dunkelspektrums von ReaChR-Y110azF (cf. Abbildung 51H) wurde das Doppeldifferenzspektrum aus Abbildung 51E mit Origin Pro zweimal hintereinander integriert. Es wurde angenommen, dass $A_\chi = 0$ und $B_\chi = 0$ sei.

2.9 pH-Titrationen

Rekombinantes Protein ($V \geq 500 \mu\text{L}$) wurde in Titrationspuffer (jeweils 10 mM Citrat, BTP & CAPS, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM, pH 3 - 5) equilibriert und in eine Halbmikro-Küvette (6Q, Starna) mit Rührfisch (3x3 mm, Carl Roth) überführt. Vor Platzierung der Küvette wurden auf dem Boden der Küvettenkammer des Photospektrometers (Cary 300 Bio, Varian) fünf Unterlegscheiben vorgelegt. Nach Zugabe von kleinen Volumina (0.5 - 1.0 μL) 1 M NaOH (Carl Roth) zur Proteinlösung wurde 1 - 2 min gerührt (Variomag Electronicrührer Micro, H + P Labortechnik GmbH) und anschließend der pH-Wert (pH-Meter 766, Knick, Mikroelektrode: Z451, SI Analytics) gemessen. Es folgte eine UV-vis-Messung. Das ganze Prozedere wurde sukzessive bis in den (stark) basischen pH-Bereich wiederholt. Die zugegebenen Volumina von Base wurden notiert und die Spektren entsprechend auf eine einheitliche Konzentration skaliert.

Die Bestimmung der pK_s -Werte von protonierbaren Aminosäureseitenketten erfolgte über zwei unterschiedliche Methoden. Entweder wurde der pH-Wert mit dem Absorptionsmaximum korreliert (Methode 1, i) oder die Absorptionsspektren wurden auf die Chromophorabsorption normiert und gegeneinander subtrahiert (sauer minus alkalisch). Die maximalen Absorptionsänderungen in den Differenzspektren wurden gegen den pH-Wert geplottet (Methode 2, ii). Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Boltzmann-Funktionen angenähert, deren Wendepunkte den pK_s -Werten entsprechen. Zur Bestimmung des pK_s -Werts der RSBH^+ (Methode 3) wurde die normierte Absorption der deprotonierten RSB-Spezies durch die normierte Absorption der protonierten RSB-Form dividiert ($A_{\text{RSB}}/A_{\text{RSBH}^+}$). Die so erhaltenen Quotienten wurden auf 0 (0 % deprotoniert) und 1 (100 % deprotoniert) normiert. Der pH-Wert bei dem 50 % der RSB deprotoniert vorlag ($A_{\text{RSB}}/A_{\text{RSBH}^+} = 0.5$), wurde dem pK_s der RSB zugeschrieben.

2.10 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen in der Ganzzellkonfiguration wurden von Johannes Vierock (AG Hegemann, HU Berlin) durchgeführt. Messaufbau und -protokoll sind beschrieben in Grimm *et al.* (2017). Die Messungen wurden unter leicht asymmetrischen Salzkonzentrationen (extrazellulär: 140 mM NaCl; intrazellulär: 110 mM NaCl & 10 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraessigsäure) durchgeführt. Beide Puffer enthielten 10 mM HEPES pH 7.2, 1 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 und 1 mM CsCl.

2.11 Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie

48 h nach der Transfektion (*cf.* Kapitel 2.4.18) wurden die Bilder mit einem FluoView FV1000-Mikroskop-System (Olympus) mit LSM IX81-Mikroskop und UPLSAPO-Objektiv (60x1.2 Wasser) aufgenommen. Der C-terminale Fluorophor (mCerulean3) wurde mit einem Diodenlaser (440 nm) angeregt und die Fluoreszenz bei 470 nm mittels Photomultiplier detektiert. Es wurden Serien aus 15 - 25 Bilder in der Z-Dimension (Auflösung: 0.5 μm /Scheibe) aufgezeichnet und mit dem Programm FluoView Viewer (Version 4.1, Olympus) evaluiert.

2.12 Bio-orthogonale Kopplung von Azidomutanten mit Fluorophoren

Wenn nicht anderweitig beschrieben, wurden alle nachfolgenden Schritte unter dimmen Rotlicht durchgeführt. Die Markierung der azF-tragenden Kanalphodopsinmutanten erfolgte nach der Immunopräzipitation des exprimierten Proteins an die 1D4-Antikörper-Sepharose (*cf.* Abbildung 49) in Analogie zu Tian *et al.* (2013). Nach quantitativer Bindung wurde das Säulenmaterial inkl. immobilisiertem Protein in ein entsprechendes Reaktionsgefäß transferiert und dreimal mit 500 μL DPBS inkl. 0.1 % (w/v) DDM für 30 min bei 4 °C gewaschen (Nutator). Der flüssige Überstand wurde jedes Mal nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, 2 krpm) abgezogen. Das pelletierte Säulenmaterial wurde im Anschluss in 200 μL DPBS inkl. 0.1 % (w/v) DDM und 0.9 μL DIBO-Alexa647-Konjugat (15 μM , Stammlösung: 5 mM in DMSO, Click-IT Alexa Fluor 647 DIBO Alkyne, Thermo Fisher Scientific) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C auf einem Nutator inkubiert. Für die Markierung von ReaChR-C168T (*cf.* Abbildung 49C) wurde die Kopplungsreaktion unter grünem Dauerlicht (505 nm, LED) durchgeführt.

Am Folgetag wurde die feste Phase in Filtereinheiten (Ultrafree-MC-HV, 0.45 μm , Merck KGaA) überführt und fünfmal mit DPBS incl. 0.1 % (w/v) DDM für 20 min unter ständiger Homogenisierung (Nutator) gewaschen. Nach jeder Zentrifugation (30 s, 2 krpm) wurde der Durchfluss abgenommen und spektroskopisch (LAMBDA-800, PerkinElmer) untersucht. Nach Ausbleiben von Absorption des freien Fluorophors ($\lambda_{\text{max}} = 654 \text{ nm}$) wurde mit der Elution in Analogie zu bereits beschriebenen Protokollen (*cf.* Kapitel 0) begonnen.

Die Kopplungseffizienz wurde über das Absorptionsverhältnis zwischen Fluorophor und Proteinchromophor ermittelt: $(A_{\text{Alexa}}/\epsilon_{\text{Alexa}})/(A_{\text{Chrom}}/\epsilon_{\text{Chrom}})$ mit $\epsilon_{\text{Alexa}} = 239.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tian *et al.* 2013) & $\epsilon_{\text{Chrom}} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ReaChR, *cf.* Abbildung 29).

2.13 Extraktion und chromatographische Trennung von Retinoiden

Extraktion von gebundenen Retinal-Molekülen mittels Ethanol und anschließender chromatographischer Trennung *via* Hochleistungschromatographie (HPLC) wurde von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt und ist beschrieben in Krause *et al.* (2017).

2.14 Software und bioinformatische Vorhersageprogramme

Tabelle 30: Software und bioinformatische Vorhersageprogramme. Wenn nicht explizit erwähnt, wurden die Programme in der Standardkonfiguration verwendet. Die organismische Taxonomie des Wirts (Eukaryot bzw. gram-negatives Bakterium) wurde bei SignalP entsprechend ausgewählt.

Software	Verwendungszweck	Referenz / Hersteller
APBS (<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>) Version 2.1 (PyMOL Plug-In)	Berechnung des elektrostatischen Potentials von Aminosäureresten und ganzen Proteinen	Baker <i>et al.</i> , 2001; Lerner & Carlson, 2006
Clustal Omega	Aminosäuresequenzvergleich	Sievers <i>et al.</i> , 2011
FluoView Version 4.1 Viewer	Evaluierung von Fluoreszenzmikroskopiebildern	Olympus
GENTle Version 1.9.4	Verwaltung von Plasmidkarten, Design von Oligonukleotiden, Durchführung von <i>in-silico</i> -Klonierungen	Magnus Manske, Universität Köln
GETAREA	Vorhersage von SASA (engl. <i>solvent accessible surface area</i>)	Fraczkiewicz & Braun, 1998
Glottan Version 1.5.1	Globale Analyse von zeitaufgelösten spektroskopischen UV-vis-Daten	Mullen & van Stokkum, 2007; Snellenburg <i>et al.</i> , 2012
Illustrator CC 2015	Grafikprogramm zur Erstellung von Schaubildern und Illustrationen	Adobe Systems
MATLAB R2013b	Auswertung, Analyse und Visualisierung von experimentellen Daten	The MathWorks Inc.
MOLE 2.0 (PyMOL Plug-In)	Vorhersage von Kavitäten, Tunneln bzw. Poren innerhalb von Proteinen	Sehnal <i>et al.</i> , 2013
NetNGlc 1.0 Server	Vorhersage von N-Glykosylierungen an Asparaginresten	Blom <i>et al.</i> , 2004
NetOGlc 4.0 Server	Vorhersage von O-Glykosylierungen an Serin- und Threoninresten	Steenftoft <i>et al.</i> , 2013
Origin Pro 8G / 9.0	Auswertung, Analyse und Visualisierung von experimentellen Daten	OriginLab Corporation
PyMOL Version 1.7.0.5	Visualisierung von Proteinstrukturen	Schrödinger LLC.
R 3.2.1	Programmiersprache, Grundlage für Glottan	R Foundation for Statistical Computing
SignalP 4.1 Server	Vorhersage von Signalpeptiden	Petersen <i>et al.</i> , 2011
SWISS-MODEL	Strukturvorhersage von Homologiemodellen	Biasini <i>et al.</i> , 2014

3. Resultate

3.1 Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in *Escherichia coli*

Im Kontext der Arbeit wurden sechs verschiedene Kanalrhodopsine (hauptsächlich deren Rhodopsindomänen) auf mögliche Konsensussequenzen (N-X-S/T, $X \neq P$) hin untersucht (Abbildung 20A). Dabei wurden je nach Gattung keine bis drei N-Glykosylierungsstellen innerhalb des extrazellulären N-Terminus, eine hochkonservierte Position im ICL2 sowie für zwei ChRs eine Stelle im intrazellulären C-Terminus ausgemacht. Intrazelluläre Glykosylierungen wurden bis dato aber nur an einer α -Einheit der Na^+, K^+ -ATPase aus der Hundeniere nachgewiesen (Hart & West 2009) und wurden daher nicht weiter berücksichtigt. Des Weiteren zeigten die Kanalrhodopsine-1 aus *C. augustae* (CaChR1) und *Dunaliella salina* (DsChR1) auf Basis der bioinformatischen Vorhersagesoftware (NetOGly) in der N-terminalen Aminosäuresequenz ein hohes Auftreten von O-Glykosylierungsstellen. Für CrChR1, ChR1 aus *Haematococcus pluvialis* (HpChR1) und DsChR1 wurden 22 - 27 AS lange N-terminale Signalsequenzen identifiziert (SignalP), welche im Zuge des co- bzw. post-translationalen Proteintransports abgespalten werden.

Um eine vermeintliche oligosaccharidabhängige Proteinfaltung in *E. coli* zu ermöglichen, wurde sich der Glykosylierungsmaschinerie Pgl aus *Campylobacter jejuni* bedient (cf. Abbildung 17). Alle sechs ChR-Sequenzen wurde dem Codon-Gebrauch des Wirts angepasst und für erste Expressionstests in einen Anhydrotetracyclin-induzierbaren pASK43-Vektor mit starkem *tetA*-Promoter und N-terminalem His₆-Tag kloniert. Es folgte die Transformation in den Glykosylierungsstamm CLM24 (kotransformiert mit pACYC_pgl), sowie als Negativkontrolle in die Expressionsstämme C41(DE3) und C43(DE3). Es wurde ein kleiner Ansatz (20 mL) unter Standardbedingungen (37 °C, LB, Induktion bei OD₆₀₀ = 0.4 - 0.6) kultiviert. Die angereicherten Zellen wurden aufgeschlossen, einer differentiellen Zentrifugation unterzogen und die relevanten Fraktionen entsprechend mit Detergens (1 - 2 % (w/v) DDM) behandelt, um die Membranproteine zu solubilisieren. Innerhalb einer semi-denaturierenden SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Zellfraktionen auf das Vorhandensein des Affinitätspeptids mittels Western Blot (*anti*-His-Antikörper) hin untersucht. Exemplarisch ist der Western Blot von CrChR1 (Abbildung 20B) dargestellt. Laut der Vorhersagesoftware NetNGlyc 1.0 (Abbildung 20A) weist CrChR1 drei extrazelluläre Glykosylierungsstellen auf, welche von der konstitutiv exprimierten Glykosylierungsmaschinerie Pgl mit einem Heptasaccharid beladen werden könnten. Im Western Blot ist allerdings kein Größenunterschied der exprimierten Proteine aus dem Glykosylierungsstamm CLM24 und den Kontrollstämmen zu verzeichnen. Als Positivkontrolle wurde das aus *Pichia pastoris*-exprimierte CrChR2-C128S mitaufgetragen. Dieses zeigt ein typisches doppeltes Bandenmuster im Größenbereich des Monomers (~ 30 kDa), welches auf die Koexistenz von glykosyliertem und nichtglykosyliertem Protein hinweist. Auch für die

anderen ChRs konnte im Western Blot kein Unterschied im Bandenmuster zwischen CLM24 und den Kontrollstämmen detektiert werden (nicht gezeigt).

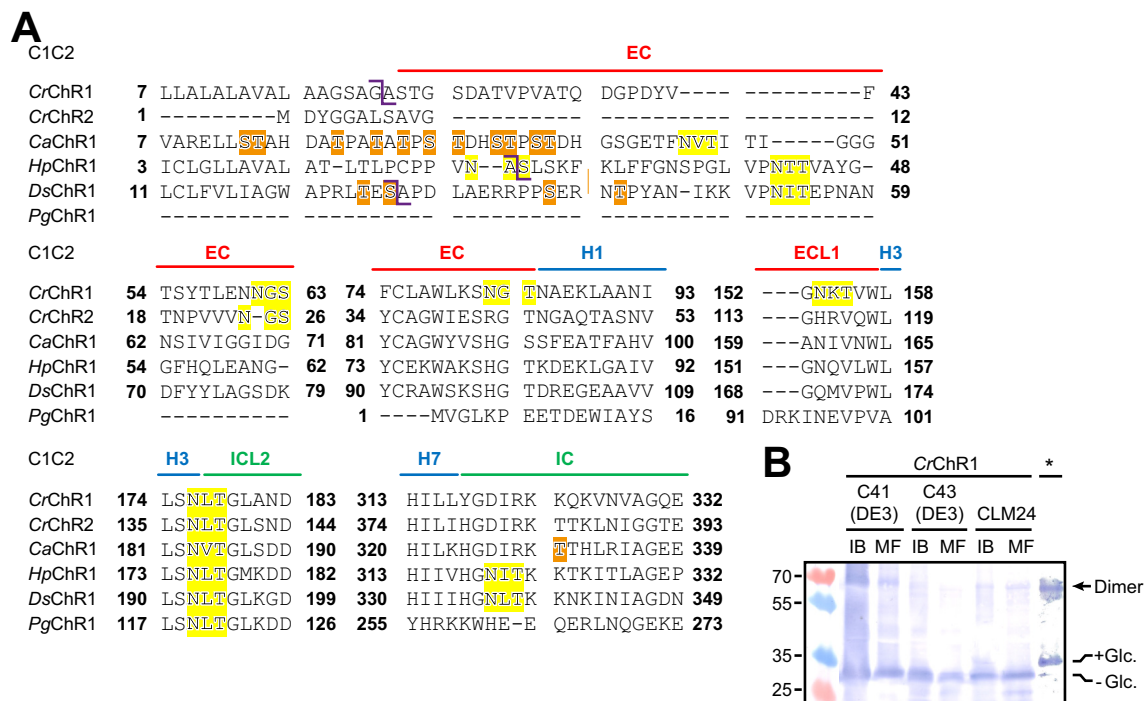


Abbildung 20: Glykosylierung von ChRs exprimiert in *Escherichia coli*. **A)** Potentielle N- (N-X-S/T, *gelb*, NetNGlyc 1.0 Server) und O-Glykosylierungen an Serin bzw. Threonin (*orange*, NetOGly 4.0 Server) sowie Schnittstellen der Signalsequenzen (*lila*, SignalP) wurden bestimmt. Strukturelle Elemente entsprechen der Kristallstruktur der ChR-Chimäre C1C2 (Kato *et al.* 2012). **B)** Western Blot (Antikörper: 1) Maus *anti*-His, 2) *anti*-Maus AP-Konjugat) nach semi-denaturierender SDS-PAGE. *E. coli*-Stamm CLM24 ist kotransformiert mit dem für die Glykosylierungsmaschinerie (Pgl) kodierenden Vektor (pACYC-*pgl*). Banden des Proteinmarkers in kDa. *CrChR2-C128S aus *P. pastoris* (Dr. Katja Stehfest, AG Hegemann, HU Berlin); M_w (CrChR2-C128S) = 38.9 kDa; M_w (CrChR1) = 35.7 kDa; +Glc., glykosyliertes Protein; -Glc., nichtglykosyliertes Protein.

Da das Kanalrhodopsin-1 aus *Pyramimonas gelidicola* (PgChR1) einen sehr kurzen N-Terminus aufweist und in der Prognose keine vermeintliche extrazelluläre Glykosylierungsstelle identifiziert werden konnte (Abbildung 20A), wurde es weiteren Expressionstests unterzogen. Als erstes wurde der initial verwendete pASK43plus-Vektor zwei weiteren induzierbaren Expressionsplasmiden (pET28c(+) & pBAD/Myc-HisB) gegenübergestellt, welche entweder einen sehr starken T7- oder einen moderaten P_{BAD} -Promoter tragen (*cf.* Tabelle 17). Abbildung 21A zeigt Western Blots der separierten Zellfraktionen aus C43(DE3) und CLM24. Bemerkenswert ist trotz der unterschiedlich starken Promotoren der hohe Anteil an fehlgefaltetem Protein innerhalb der Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*, IB). Bemessen an der Signalstärke der solubilisierten Membranfraktionen (SN MF) wurde der höchste Expressionsgrad für den pASK43-Vektor erzielt, mit welchem fortan am meisten gearbeitet wurde.

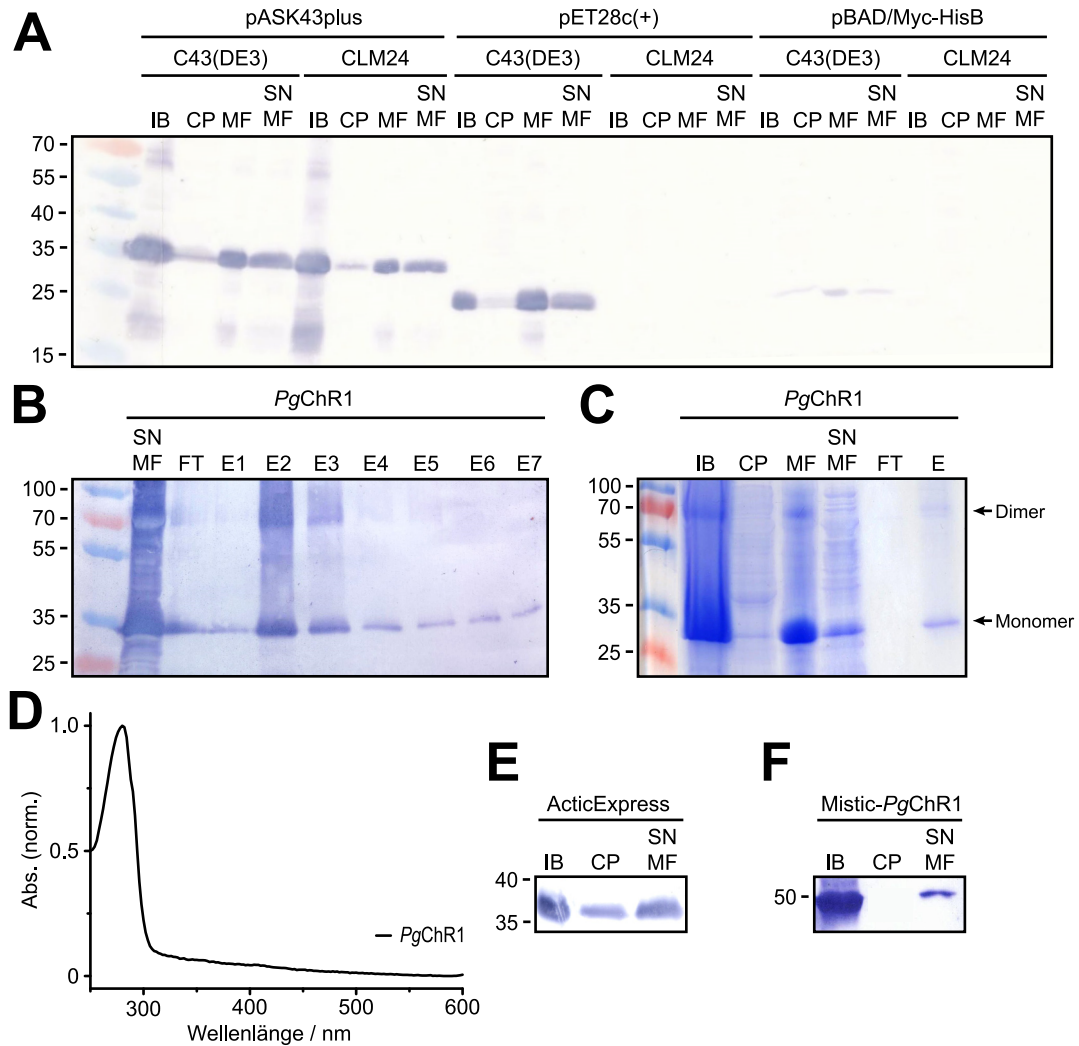


Abbildung 21: Expression von *PgChR1* in *E. coli*. **A)** Western Blot nach semi-denaturierender SDS-PAGE. Expression bei 30 °C. Banden des Proteinmarkers in kDa. *E. coli*-Stamm CLM24 ist immer kotransformiert mit pACYC_*pgl* (Glykosylierungskaskade aus *C. jejuni*). $M_w(PgChR1)$ = 38.9 kDa (pASK43plus), 35.2 kDa (pET28c(+)) & 36.4 kDa (pBAD/Myc-HisB). **B)** Western Blot nach Expression (pASK43plus) in CLM24 bei 19 °C. **C)** Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel nach Elektrophorese. **D)** UV-vis-Absorptionsspektrum der konzentrierten Eluate. **E)** Western Blot der Expression bei 10 °C in Anwesenheit der Chaperone Cpn10 & Cpn60 aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica* in ArcticExpress(DE3) RIL-Zellen. **F)** Western Blot der Expression bei 19 °C des N-terminalen Mistic-Fusionskonstrukts in pET21a. $M_w(Mistic-PgChR1)$ = 49.9 kDa. Western Blots in A, B, E und F mit folgenden Antikörpern: 1) Maus *anti*-His, 2) *anti*-Maus AP-Konjugat.

Da sich eine reduzierte Temperatur positiv auf die Faltungseffizienz des exprimierten Proteins auswirken kann, wurde *PgChR1* unter anderem bei 19 °C exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie isoliert. Das Protein konnte bis zur Homogenität aufgereinigt werden und zeigte nahezu keine Verunreinigungen (Abbildung 21B, C). Auch das UV-vis-Absorptionsspektrum des konzentrierten Eluates wies neben einem distinkten Proteinpeak bei 280 nm nur eine kleine Bande bei ca. 410 nm auf, welche geringen Mengen von hämbindenden Cytochromen der prokaryotischen Atmungskette zugeordnet werden kann

(Soret-Bande). Hingegen konnte eine Chromophorabsorption zwischen 350 und 600 nm nicht beobachtet werden.

Tabelle 31: Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in *E. coli*. Alle verwendeten DNA-Sequenzen sind codonoptimiert für *E. coli* (c). Stamm CLM24 ist kotransformiert mit pACYC_pgl (Koexpression der Glykosylierungsmaschinerie aus *Campylobacter jejuni*, PglA-K). Für eine konkrete Beschreibung der Gene, Zellen, Vektoren, Expressions- und Aufreinigungsbedingungen siehe Kapitel 2.

Gen	Vektor	Affinitäts-Tag	<i>E. coli</i> -Stamm	Auxiliare	Expressionsbedingungen
eCaChR1	pASK43+	His ₆	C41(DE3)	-	37 °C, 19 °C ± 2xM9
eCaChR1	pASK43+	His ₆	C43(DE3)	-	37 °C, 19 °C
eCaChR1	pASK43+	His ₆	CLM24	-	19 °C
eCaChR1	pET21b	His ₆	C43(DE3)	Mistic	19 °C
eCrChR1	pASK43+	His ₆	C41(DE3)	-	19 °C ± 2xM9
eCrChR1	pASK43+	His ₆	C43(DE3), CLM24	-	19 °C
eCrChR2	pASK43+	His ₆	C43(DE3)	-	19 °C
eDsChR	pASK7+	Strep-Tag II	C41(DE3), C43(DE3), CLM24	-	37 °C
eDsChR	pASK43+	His ₆	C41(DE3), C43(DE3), CLM24	-	37 °C, 30 °C, 19 °C
eHpChR1	pASK43+	His ₆	C41(DE3)	-	19 °C
eHpChR1	pASK43+	His ₆	CLM24	-	37 °C, 19 °C ± 2xM9
eHpChR1	pASK43+	His ₆	C43(DE3)	-	37 °C, 19 °C
eHpChR1	pET21b	His ₆	C43(DE3)	Mistic	19 °C
ePgChR1	pASK43+	His ₆	C41(DE3)	-	19 °C
ePgChR1	pASK43+	His ₆	C43(DE3)	-	37 °C, 30 °C, 19 °C
ePgChR1	pASK43+	His ₆	CLM24	-	37 °C, 30 °C, 19 °C ± 2xM9
ePgChR1	pASK43+	Strep-Tag II	CLM24	-	19 °C
ePgChR1	pASK43+	His ₆	ArEx(DE3)	Cpn10 & 60	10 °C
ePgChR1	pBAD/Myc-HisB	His ₆	C43(DE3), CLM24	-	37 °C, 30 °C, 19 °C
ePgChR1	pBAD/Myc-HisB	His ₆	ArEx(DE3)	Cpn10 & 60	10 °C
ePgChR1	pET21b	His ₆	C43(DE3)	Mistic	19 °C
ePgChR1	pET27b(+)	His ₆	C43(DE3)	PelB	19 °C
ePgChR1	pET27b(+)	His ₆	ArEx(DE3)	Cpn10 & 60, PelB	10 °C
ePgChR1	pET28c(+)	His ₆	C43(DE3), CLM24	-	37 °C, 30 °C, 19 °C
ePgChR1	pET28c(+)	His ₆	ArEx(DE3)	Cpn10 & 60	10 °C
eCrHKR1	pASK43+	His ₆ , Strep-Tag II	C43(DE3)	-	19 °C
eOthKR1	pASK43+	His ₆ , Strep-Tag II	C43(DE3)	-	19 °C

Im weiteren Verlauf wurde versucht eine Cofaktorbindung für PgChR1 sowie die anderen ChRs durch diverse Strategien zu erzielen. Neben der Verwendung von Glukose- und Ammoniumchlorid-angereichertem Minimalmedium (2xM9), einem anderen Affinitätstag (Strep-Tag II) und eines periplasmatischen Signalpeptids aus dem Enterobakterium *Erwinia carotovora* (PelB) wurde auch der Effekt von kalteadaptierten Chaperonen (Cpn10 & Cpn60) aus dem psychophilen Bakterium *Oleispira antarctica* untersucht. Diese äußerst kühlen „Anstandsdamen“ unterstützen die Proteinfaltung im Wirtsorganismus und ermöglichen, wenn kotransformiert, eine Expression von rekombinantem Protein bei Temperaturen von 4 - 12 °C (Ferrer *et al.* 2003). Obwohl der Anteil an fehlgefaltetem Protein bei der 10 °C-Expression innerhalb der Einschlusskörperchen zugunsten der Membranfraktion abnahm (Abbildung 21E), blieb ein erwünschter Effekt auf die Assoziation des Retinal-Moleküls für PgChR1 aus und die Spektren der Eluatfraktionen zeigten keine Chromophorbande (nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde der Einfluss der N-terminalen Fusionierung des Mistic-Proteins (engl. *membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs*) (cf. Kapitel 1.4) für PgChR1, CaChR1 und HpChR1 untersucht. In den initialen Expressionstests und nachfolgender Proteinanalytik (SDS-PAGE & Western Blot) konnte nur ein positives Signal für PgChR1 detektiert werden, jedoch war das Gros des Proteins innerhalb der unlöslichen Fraktion akkumuliert und nur ein schwaches Signal war für die solubilisierete Membranfraktion auszumachen (Abbildung 21F). Auch in einem größer angelegten Expressionsansatz konnte kein Holoprotein identifiziert werden (nicht gezeigt).

Da die unfunktionale Expression in *E. coli* eventuell intrinsischen Eigenschaften der ChRs geschuldet ist, wurden zusätzlich zwei andere mikrobielle Rhodopsine aus Algen untersucht. Es handelte sich dabei um die Rhodopsindomänen der Histidin-Kinase-Rhodopsine aus *C. reinhardtii* (CrHKR1) und *Ostreococcus taurii* (OtHKR1). Beide Gene wurden ebenfalls codonadaptiert, synthetisiert (GenScript), in das pASK43-Plasmid kloniert und in C43(DE3) bei 19 °C exprimiert. Während in den Western Blots ein vielversprechendes Signal in der Membranfraktion von CrHKR1 beobachtet wurde, konnte sowohl in der Nickel- als auch in der Streptactin-Aufreinigung nur Cytochrom in den Eluaten detektiert werden (nicht gezeigt). Tabelle 31 fasst alle unternommenen Expressionen sowie die jeweiligen Kultivierungsbedingungen zusammen.

3.2 Charakterisierung von CrChR2(-H134R) und C1C2

3.2.1 Expression

Zu Beginn der Arbeit standen zwei Zellkultursysteme für die Expression von mikrobiellen Rhodopsinen zur Verfügung. Neben COS-1-Zellen war eine stabil transfizierte CrChR2-HEK293-Tet-On-Zelllinie als Expressionssystem etabliert. Als erstes wurde CrChR2 in der adhärierenden stabil transfizierten HEK293-Tet-On-Zelllinie (generiert von Dr. Katja Stehfest, AG Hegemann, HU Berlin, cf. Kapitel 2.4.3) exprimiert und nach einem etablierten Protokoll mittels Immunoaffinitätschromatographie (1D4-Antikörper) aufgereinigt. Im Rahmen der Studie wurde der Einfluss von Valproinsäure (VPS) auf den Expressionsgrad untersucht. Integrität und Funktionalität der rekombinanten Photorezeptoren wurde mittels Western Blot und UV-vis-Absorptionsspektroskopie überprüft (Abbildung 22).

Der Western Blot lieferte für nahezu alle Proben ein ähnliches Bandenmuster bestehend aus einer dominanten höhermolekularen und einer weniger ausgeprägten niedermolekularen Bande in der Größenordnung des CrChR2-Dimers (≥ 70 kDa). In Analogie zu V1V2-25 (Ernst *et al.* 2008) wurde die Hauptfraktion mit dem größeren Molekulargewicht glykosyliertem Protein zugeordnet. Trotz semi-denaturierender (1.67 % (w/v) SDS, ohne thermische Behandlung > 90 °C) und reduzierender Bedingungen (1.67 % (v/v) β -Mercaptoethanol) während der Gelelektrophorese, waren nur marginale Anteile von Monomer zu verzeichnen. Dieser Befund impliziert eine hohe Bindungsaffinität der beiden Protomere zueinander, unabhängig von

stabilisierenden Disulfidbrücken. Diese Vermutung lässt sich durch die ausgeprägte interprotomere Wechselwirkung des C1C2-Dimers unterstützen (Kato *et al.* 2012). Bemerkenswerterweise wiesen auch nichtinduzierte Zellen eine erhebliche basale Expression auf, welche durch den Zusatz von VPS sogar auf das Niveau der übrigen Proben gesteigert wurde. Backliwal *et al.* berichteten von einer signifikanten Steigerung der Produktivität von HEK293-Zellen in Anwesenheit des Histon-Deacetylase-Inhibitors VPS (Backliwal *et al.* 2008). Jedoch war bei den induzierten Proben weder im Western Blot noch in den UV-vis-Spektren (nicht gezeigt) eine weitere Steigerung durch den Zusatz von VPS zu beobachten. Die höchste Expressionsrate unter den getesteten Bedingungen wurde nach 48 h erreicht.

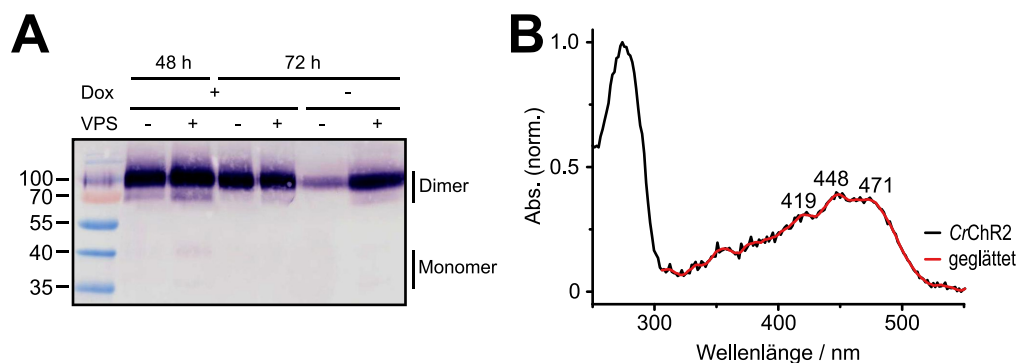


Abbildung 22: Expression von CrChR2 in stabil transfizierter HEK293-Tet-On-Zelllinie. A) Western Blot (Antikörper: 1) Maus *anti*-His, 2) *anti*-Maus AP-Konjugat) nach semi-denaturierender SDS-PAGE von Zelllysaten (nach Solubilisierung) nach 48 bzw. 72 h Expression mit (+) oder ohne (-) Zusatz von Valproinsäure (VPS, 4 mM) bzw. mit (+) oder ohne (-) Induktion (Doxycyclin, Dox, 500 ng/mL). Banden des Proteinmarkers in kDa. M_w (CrChR2-1D4) = 35.3 kDa. **B)** UV-vis-Spektrum von isoliertem CrChR2 (1D4-Aufreinigung). Spektrum wurde zur besseren Ansicht im Chromophorbereich geglättet (rot, Savitzky-Golay: 30 Punkte, Polynom fünften Grades).

Obwohl isoliertes CrChR2 eine vergleichbare Reinheit ($A_{280}/A_{448} = 2.57$) zu früheren Referenzwerten (persönliche Kommunikation mit Dr. Katja Stehfest, AG Hegemann, HU Berlin) aufwies, war die Ausbeute ($1.42 \mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche) gering. Im stark verrauschten UV-vis-Spektrum ist nur schwer die für CrChR2 charakteristische Feinstruktur des Chromophors auszumachen (Abbildung 22B).

Zur Vergrößerung der Biomasse und Vereinfachung der Handhabung sollte die stabile CrChR2-HEK293-Tet-On-Zelllinie an das Wachstum in Suspension adaptiert werden und in einem Bioreaktor zur hochdichten Kultivierung verwendet werden. Da die Zelladhäsion von HEK293-Zellen an Wachstumsflächen hauptsächlich durch die im fötalen Kälberserum (FKS) enthaltenen Proteine mediert wird, erfordert die Kultivierung in Suspension einen Verzicht auf FKS. In Analogie zu van der Valk *et al.* und Angaben von Medienhersteller (SAFC Bioscience) erfolgte die Entwöhnung über 2 - 8 Passagen, in denen der Gehalt an FKS sukzessive von 10 auf 0 % (v/v) reduziert wurde (van der Valk *et al.* 2010). Es wurden speziell für die Suspensionskultivierung designte serumfreie Medien (EX-CELL293, FreeStyle293 & RPMI1640) für den Adaptationsprozess sowie die spätere Kultivierung verwendet und fünf verschiedene Protokolle verwendet: 1) Direkte Adaptation an serumfreies Medium 2) Adaptation durch stufenweise Reduktion von Serum in serumfreiem Medium 3) Sequentielle Adaptation

durch Mischungen aus serumhaltigen und -freiem Medium 4) Adaptation durch Mischungen aus konditioniertem und serumfreiem Medium 5) Adhärenzte Kultivierung in serumfreiem Medium und anschließende Überführung in Schüttelkulturen (*inside-Adaptation*) (cf. Kapitel 2.4.12).

Zellen wurden unter kontinuierlicher Durchmischung auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 100 - 200 rpm im Brutschrank kultiviert und Morphologie, Zellpopulation, Vitalität, pH-Wert und Glukosekonzentration in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Etwaige Mangelerscheinungen wurden entsprechend behoben. In den ersten serumreduzierten Passagen kam es zu großen Agglomerationen vieler Zellen, welche zum Teil auf dem Boden des Erlmeyerkolbens sedimentierten. Mittels enzymatischem Verdau mit Trypsin oder durch mechanische Scherkräfte konnten größere Zellverbände erfolgreich vereinzelt werden. Die Verklumpung der Zellen ging häufig mit einem massiven Zellsterben einher, welches trotz der hohen Konzentration an Puffersubstanzen im Medium und in der Raumluft (44 mM NaHCO₃ & 5 % CO₂, pH 7.65) zu einer starken Azidifizierung der Kultur führte. Zwar wurde diesem durch die Substitution frischen Mediums entgegengewirkt, jedoch reduzierte sich die Vitalität bei längerer Exposition drastisch. Ausschließlich vitale und einzellige Zellen wurden in nachfolgende Passagen mit einer Dichte von 0.5 - 1.0x10⁶ Zellen/mL überführt und bis 3 - 5x10⁶ Zellen/mL inkubiert. Obwohl die Anzahl großer Zellaggregate mit der Zeit signifikant reduziert werden konnte, wurde nur in EX-CELL293 Medium eine einigermaßen monodisperse Suspension erhalten. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Protokoll 1 erzielt. Jedoch war auch hier die Bildung einer erheblichen Zellkruste oberhalb der Flüssigkeitskante nach vermeintlich vollständiger Adaptation auszumachen.

Die Suspensionsadaptation der stabilen Zelllinie war unter den hiesigen Umständen nicht erfolgreich. Eine mögliche Ursache könnte in der mangelhaften Homogenisierung durch den nicht eigens für diesen Zweck konzipierten Schüttler begründet sein. Des Weiteren bietet die Verwendung von Glaskolben ein Potential für die Akkumulation von Toxinen. Die ungenaue manuelle Zellzahlbestimmung der teils stark aggregierten Zellen mithilfe eines Hämacytometers (Neubauerzählkammer) verursachte einen moderaten bis großen systematischen Fehler. Bei Unter- bzw. Überschreiten kritischer Zelldichten wird ein erhöhtes Zellsterben bzw. eine Tendenz zur Verklumpung begünstigt.

Da die Suspensionsadaptation nicht von Erfolg gekrönt war, wurde die Expression bei adhärierendem Wachstum weiter optimiert. Dabei wurde unter anderem auch der Einfluss von verschiedenen Induktor-Konzentrationen (50 & 100 ng/mL) analysiert, jedoch konnte die Menge an rekombinantem Protein nicht weiter gesteigert werden. Über den Kultivierungszeitraum von 3.5 Monaten (bis Passage 26) war sogar ein gegenläufiger Trend und gegen Ende sogar ein kompletter Einbruch der Expression zu beobachten. Die große Diskrepanz an Proteinquantität und die graduelle Reduktion an Produktivität könnte mit der Koexistenz mehrerer Subpopulationen innerhalb des verwendeten Klons Nr. 6 erklärt werden, indem die initial selektierte gut exprimierende Spezies eine langsamere Proliferation als die vergesellschafteten Transformanten aufweist und so im Laufe einiger Passagen zu einer Minorität degradiert. Die Überlegung wird durch eine persönliche Kommunikation mit Dr. Katja Stehfest (AG Hegemann, HU Berlin) gestützt. Bei der von ihr durchgeführten Selektionierung des hier

verwendeten Klons kam es zur Ausbildung großer, dichter Kolonien, welche die Trennung isolierter Transformanten erschwerte. Aufgrund der geringen Expressionswerte in adhärenter Kultivierung und der nicht realisierten Suspensionsadaptation wurde die Proteinproduktion aus der stabilen Zelllinie eingestellt.

In Analogie zu publizierten Expressionen wurde das Hybrid C1C2 alleine und mit C-terminalem Fluoreszenzprotein (mCherry, Shaner *et al.*, 2004) aus COS-1 exprimiert, *via* Affinitätschromatographie (1D4) aufgereinigt und die rekombinanten Proteine mittels Western Blot und spektroskopischen Methoden untersucht (Abbildung 23).

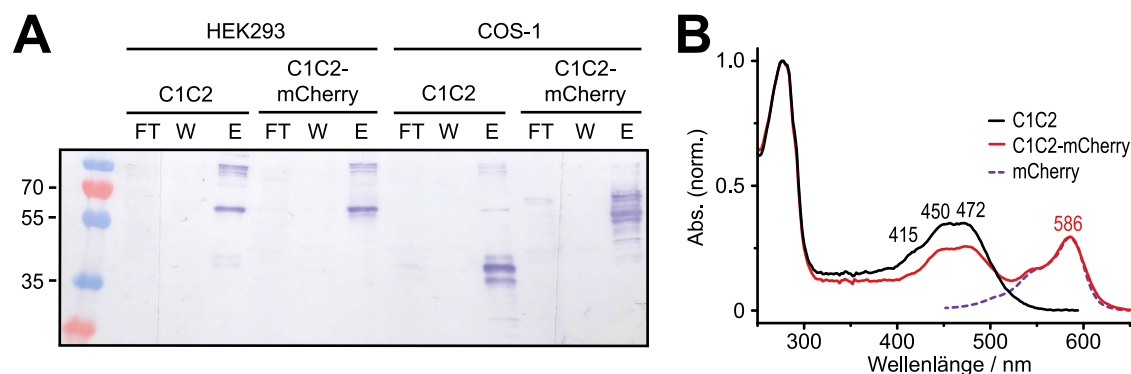


Abbildung 23: Expression von C1C2 in HEK293 und COS-1. A) Western Blot (Antikörper: 1) Maus *anti*-His, 2) *anti*-Maus AP-Konjugat) nach elektrophoretischer Trennung mittels semi-denaturierender SDS-PAGE. Proben wurden während der Aufreinigung gezogen. Banden des Proteinmarkers in kDa. M_w = 41.2 kDa (C1C2-His₁₀) & 67.7 kDa (C1C2-mCherry-His₁₀) B) UV-vis-Spektren von C1C2 (*schwarz*) und C1C2-mCherry (*rot*) aufgereinigt aus COS-1-Zellen. Aufreinigung erfolgte mittels Immunoaffinitätschromatographie (1D4). Spektrum von mCherry (*lila*, pH 8.2) ist entnommen aus Shu *et al.* (2006).

Im Western Blot ist für C1C2 aus COS-1 wie für *CrChR2* (*cf.* Abbildung 22A) die charakteristische Doppelbande aus glykosylierter und nichtglykosylierter Proteinfraction detektierbar, jedoch ist für C1C2 ausschließlich Monomer zu beobachten. Eine gewisse Größendiskrepanz zwischen dem erwarteten (41.2 kDa) und detektierten Molekulargewicht (~37 & 40 kDa) kann zumindest teilweise mit der abgespalteten Signalsequenz (1 - 23 AS, ~2.2 kDa) erklärt werden (Kato *et al.* 2012). Isoliertes Protein zeigt im Absorptionsspektrum ein doppeltes Maximum bei 450 und 472 nm mit einer Schulter bei 415 nm. Es wurde ein Protein-zu-Chromophor-Verhältnis (A_{280}/A_{472}) von 2.82 und eine Ausbeute von 4.44 $\mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche erzielt. Die Ausbeute an heterolog exprimiertem mCherry-Fusionskonstrukt ist gegenüber dem WT deutlich reduziert (2.37 $\mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$), was nicht an einer schlechteren Exposition des 1D4-Epitops und einhergehender geringerer Bindungsaffinität zum Säulenmaterial zu begründen ist (Abbildung 23A, FT). Vielmehr könnte der amphipathische Charakter (hydrophobe Rhodopsindomäne *vs.* hydrophiler Fluorophor) des Fusionsproteins eine schlechtere Solubilisierung und somit Proteinausbeute verursachen. Die hohe Anzahl an niedermolekularen Banden (< 55 kDa) bei C1C2-mCherry könnte auf damit assoziierte Proteinaggregation hinweisen. Da der Fluorophor auch im fernen UV-Bereich (200 - 280 nm)

absorbiert ($\lambda < 450$ nm nicht gezeigt), kann in diesem Fall nicht das A_{280}/A_{472} -Verhältnis als direkter Indikator für die Reinheit des Fusionskonstrukts hinzugezogen werden.

Vergrößerung der Kultivierungsfläche der adhärent wachsenden COS-1-Zellen in Rollerflaschen (850 cm² Wachstumsfläche) lieferte eine geringere Produktivität und Qualität des rekombinanten Proteins (Tabelle 32) und wurde deswegen nicht weiterverfolgt. Um die hohen Kosten der Aufreinigung mittels monoklonaler 1D4-Antikörper zu reduzieren, wurde C1C2 bzw. C1C2-mCherry nach Modifizierung des C-terminalen Affinitätspeptids mit Nickel- bzw. Streptavidin-Chromatographie isoliert. Jedoch waren die Ausbeuten sowie die Proteinreinheiten deutlich schlechter im Vergleich zur Immunopräzipitation (Tabelle 32).

Um die Proteinausbeute weiter zu steigern, wurde sich auch anderer Zellsystems wie HEK293 und CHO-K1 bedient. Die DNA-Transfektion der HEK293-Zellen wurde mit drei verschiedenen Reagenzien in Analogie zu etablierten Protokollen sowie Herstellerangaben durchgeführt (*cf.* Kapitel 2.4.18), wobei sich bei der eingesetzten DNA-Menge (3.5 - 13.24 μ g / 75 cm²) an der COS-1-Transfektion sowie publizierten HEK293-Protokollen (Ye *et al.* 2008; Naganathan *et al.* 2013) orientiert wurde. Als erstes wurde mit dem in der Elektrophysiologie üblichen Transfektionsreagenz FuGene HD (Promega) gearbeitet. Entgegen der Erwartung konnten jedoch keine substantiellen Proteinmengen angereichert werden. Im Western Blot ist neben unspezifischen Proteinbanden bei ca. 60 und 100 kDa für C1C2 ein nur sehr schwaches Bandenmuster in der erwarteten Größenordnung (≥ 35 kDa) auszumachen (Abbildung 23A). Die schwache Expression korreliert mit einer sehr kleinen Chromophorabsorption ($A_{472} \leq 5$ mOD) in den konzentrierten Eluaten (nicht gezeigt) und einer Ausbeute von 0.44 μ g / 55 cm², ca. 10fach weniger als in der analogen COS-1 Expression. Auch bei Veränderung des Vektors, des Transfektionsreagenzes sowie der Aufreinigungsmethode konnten keine größeren Mengen an funktionellem Protein aus HEK293 generiert werden (Tabelle 32).

Abhilfe verschafften zwei modifizierte HEK293-Zelllinien. In den kommerziell erhältlichen FreeStyle 293-F Zellen (Thermo Fisher Scientific), welche in Suspension kultiviert werden, war für alle getesteten Konstrukte ein deutliches Signal im Western Blot zu detektieren (Abbildung 24A). Dabei zeigten C1C2 und das mCherry-Fusionskonstrukt jeweils Fraktionen aus Monomer- und Dimer-Spezies. Der Expressionsgrad war in den adhärent wachsenden HEK293T-Zellen sogar noch größer. Die höchste Wildtyp-Expression in HEK293T, bemessen am Western Blot, wurde in dem pMT4-Vektor erzielt, welcher fortan als Standardvektor verwendet wurde.

Innerhalb zeitaufgelöster Expressionsstudien wurde für C1C2 die größte Proteinausbeute 36 h nach der Transfektion beobachtet (Abbildung 24B). Bemerkenswerterweise beeinflusste die Anwesenheit des Cofaktors Retinal während der Expression den Oligomerisierungsgrad des Photorezeptors. Während die retinalfreie Expression sowohl Monomer als auch Dimer begünstigt, katalysiert die Supplementation der prosthetischen Gruppe die Dissoziation in getrennte Monomere bzw. inhibiert deren Dimerisierung.

Tabelle 32: Expression von blau-absorbierenden ChRs in Säugerzellen. Ausbeutenberechnung mit $\epsilon_{\text{Chrom}} = 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Stehfest & Hegemann 2010) für WT-Proteine bzw. mit $\epsilon_{586} = 72.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Shaner *et al.* 2004) für mCherry-Fusionskonstrukte bezogen auf Wachstumsfläche von 55 cm^2 bzw. 20×10^6 Zellen; *Rollflaschen-Kultivierung. DEAE, Diethylaminoethyl-Dextran; PEI, Polyethylenimin; LTX; Lipofectamine LTX; n.f., nicht funktional impliziert das Ausbleiben einer Chromophorabsorption im UV-vis-Spektrum.

ChR	Vektor	Expressionssystem	Transfektion	Affinitäts-Tag	$A_{280} / A_{\text{Chrom}}$	Ausbeute / μg
C1C2	pMT4	COS-1	DEAE / Chloroquin	1D4	2.82	4.44
C1C2	pMT4	COS-1*	DEAE / Chloroquin	1D4	15	0.28
C1C2	pMT4	COS-1	DEAE / Chloroquin	His ₁₀	18.28	1.17
C1C2	pMT4	CHO-K1	DEAE / Chloroquin	1D4	-	n.f.
C1C2	pMT4	CHO-K1	FuGene HD	His ₁₀	-	n.f.
C1C2	pcDNA3.1(+)	CHO-K1	PEI	1D4	-	n.f.
C1C2	pMT4	HEK293	FuGene HD	1D4	-	0.44
C1C2	pMT4	HEK293	PEI	1D4	-	n.f.
C1C2	pMT4	HEK293	PEI	His ₁₀	-	n.f.
C1C2	pMT4	HEK293	LTX / PLUS	1D4	-	n.f.
C1C2	pcDNA3.1(+)	HEK293	LTX / PLUS	1D4	-	n.f.
C1C2	pMT4	FreeStyle 293-F	FreeStyle MAX	1D4	-	1.05
C1C2	pcDNA3.1(+)	FreeStyle 293-F	FreeStyle MAX	1D4	-	1.60
C1C2	pMT4	HEK293T	Lipofectamine / PLUS	1D4	2.64	2.99
C1C2	pcDNA3.1(+)	HEK293T	Lipofectamine / PLUS	1D4	3.13	3.61
C1C2-mCherry	pMT4	COS-1	DEAE / Chloroquin	1D4	3.89	2.37
C1C2-mCherry	pMT4	COS-1	DEAE / Chloroquin	His ₁₀	11.6	0.84
C1C2-mCherry	pMT4	COS-1*	DEAE / Chloroquin	His ₁₀	8.98	0.68
C1C2-mCherry	pMT4	COS-1	DEAE / Chloroquin	Strep-Tag II	-	n.f.
C1C2-mCherry	pMT4	HEK293	FuGene HD	1D4	-	n.f.
C1C2-mCherry	pMT4	HEK293	FuGene HD	His ₁₀	-	n.f.
C1C2-mCherry	pcDNA3.1(+)	HEK293	PEI	1D4	-	n.f.
C1C2-mCherry	pMT4	HEK293	LTX / PLUS	1D4	-	n.f.
C1C2-mCherry	pMT4	CHO-K1	DEAE / Chloroquin	1D4	-	n.f.
CrChR2	pTRE-tight	HEK-Tet-On (stabil)	Induktion mit Doxycyclin	1D4	2.57	1.15 - 1.42
CrChR2	pMT4	HEK293T	Lipofectamine / PLUS	1D4	2.44	10.73

Zur genaueren Analyse der Oligomerisierungszustände und Glykosylierungen wurde aufgereinigtes C1C2 thermisch denaturiert (ΔT , 15 min, 90 °C) und/oder mit Peptidyl-N-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt. PNGaseF spaltet spezifisch N-glykosidische Bindungen zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin und kann somit zur Identifizierung von post-translationalen Glykosylierungen genutzt werden (Freeze & Kranz 2008). Unter semi-denaturierenden Bedingungen (0.5 % (w/v) SDS & 25 mM DTT) ist neben drei Banden im Größenbereich des Monomers (ca. 35, 37 & 40 kDa) auch eine diffuse Doppelbande im Dimersegment (~70 - 90 kDa) auszumachen (Abbildung 24C). Letztere wurde in der erhitzten Probe nicht detektiert. Dieser Befund weist auf eine thermischinduzierte Monomerisierung von C1C2 hin. Bei Behandlung mit PNGaseF ($\pm \Delta T$) vor der Gelelektrophorese sind nur zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 27 und 35 kDa auszumachen, jedoch kein höheres Oligomer. Da die 35 kDa Bande im Vergleich zu den unbehandelten Proben an Intensität dazugewonnen hat, kann sie dem Aglycon zugeordnet werden. Demzufolge stellen die höhermolekularen Banden bei 37 und 40 kDa C1C2-Glykoside mit unterschiedlich komplexen Oligosacchariden oder/und eine unvollständige Kohlenhydratanbindung an die drei

vorhergesagten extrazellulären Glykosylierungsstellen (N61, N82 & N153, N-X-S/T, $X \neq P$, *qf.* Abbildung 20A) dar. Es ist bekannt, dass tierische Zellen im Rahmen der heterologen Expression zu einer heterogenen Glykosylierung tendieren (Reeves *et al.* 2002). Da sich der Oligomerisierungszustand bereits bei Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindungen zugunsten des Monomers verschiebt, erscheint eine funktionelle Relevanz der Oligosaccharide auf die Dimerisierung wahrscheinlich.

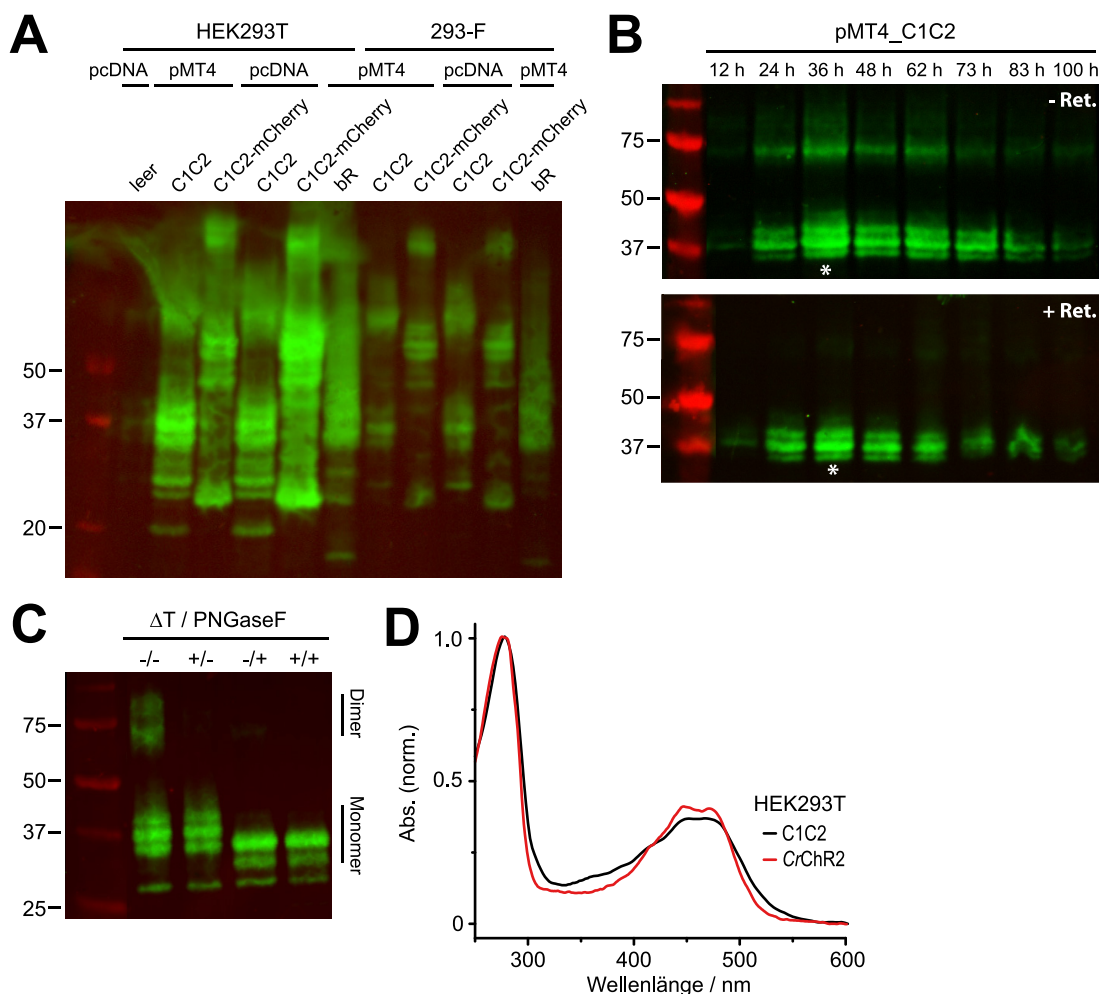


Abbildung 24: Expression von C1C2 und CrChR2 in HEK293T und FreeStyle 293-F. A) Western Blot (Antikörper: 1) Hybridoma 1D4, 2) *anti*-Maus IRDye 800CW) nach SDS-PAGE von Zelllysaten (28 μ g Protein/Tasche). Nichtcodierender pcDNA3.1(+) (leer) bzw. bovines Rhodopsin (bR) wurden zur Kontrolle bzw. als Referenz verwendet. Banden des Proteinmarkers in kDa. M_w = 40.8 kDa (C1C2-1D4); 67.4 kDa (C1C2-mCherry-1D4) & 39.5 kDa (bR-1D4) **B)** Zeitaufgelöste Expressionsstudie an C1C2 in An- (+Ret.) bzw. Abwesenheit von Retinal (-Ret.). Probenentnahme nach der Transfektion von 293-F-Zellen. Maximale Expression nach 36 h (*Stern*). Western Blot wie in A). Es wurden 33 μ g Protein des Zelllysats/Tasche für die Elektrophorese geladen. **C)** Oligomerisierung und Glykosylierung in rekombinantem C1C2. Vor elektrophoretischer Trennung wurde isoliertes C1C2 (40 ng) thermisch denaturiert (ΔT , 15 min, 90 °C) und/oder mit Peptidyl-*N*-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt. Western Blot wie in B). **D)** UV-vis-Spektrum von aufgereinigtem C1C2 und CrChR2 aus HEK293T (1D4-Aufreinigung).

Die Natur der Bande bei ca. 27 kDa nach PNGaseF-Verdau wirft weitere Fragen auf. Es könnte sich um ein weniger voluminöses bzw. vollständiger denaturiertes (Ent-)Faltungsprodukt

handeln, welches aufgrund seiner kleineren räumlichen Struktur tiefer in das Polyacrylamidnetzwerk migrieren kann. Alternativ wäre eine Protolyse am N-Terminus denkbar, da eine Verkürzung am C-Terminus das Epitop entfernen würde und so das Protein nicht mehr im Blot zu detektieren wäre. Da während der Proteinaufreinigung mit Proteaseinhibitor gearbeitet wurde, wäre nur eine Autoprotolyse, z.B. durch ein DP-Motiv, denkbar, dennoch ist solch eine Sequenz nicht im N-Terminus konserviert. Grundsätzlich könnte die relative hohe Anzahl an **PEST**-Resten (3 **P**rolin, 2 Glutaminsäure (**E**), 5 **S**erin & 6 **T**hreonin) sowie destabilisierende Aminosäuren nach der *N-end rule* (3 Glutamine, 5 Asparagine & 3 Cysteine) den N-Terminus (61 AS, nach Abspaltung des Signalpeptids) destabilisieren und eine zumindest partielle Degradation *via* Ubiquitin-Proteasom-System verursachen (Rogers *et al.* 1986; Bachmair *et al.* 1986; Gonda *et al.* 1989; Tasaki *et al.* 2012). Als letzte und wahrscheinlichste Hypothese lässt sich die Bande bei ca. 27 kDa durch Dissoziation der kleinen Kette des 1D4-Immunoglobulins G (~25 kDa) während der Aufreinigung erklären.

Die Expression von C1C2 aus HEK293T (pMT4-Vektor) lieferte mit $2.99 \mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$ zwar eine geringere Ausbeute als aus COS-1, jedoch besticht das präparierte Protein mit einem besseren A_{280}/A_{470} von 2.64 (Abbildung 24D). Die analoge Expression und nachfolgende Aufreinigung lieferte für CrChR2 sogar eine 3.5fache größere Expression ($10.73 \mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$) im Vergleich zu C1C2. Gegenüber CrChR2 aus der stabilen HEK293-Tet-On-Zelllinie war die Proteinquantität mehr als 7.5fach gesteigert und der isolierte Photorezeptor war weniger verunreinigt ($A_{280}/A_{447} = 2.44$) (Tabelle 32).

Im Rahmen der vorliegenden Expressionsstudie wurde auch das Potential von CHO-K1 als Expressionssystem für ChRs getestet. Unter den getesteten Bedingungen konnte allerdings in keinem Fall eine Chromophorabsorption nach Proteinaufreinigung nachgewiesen werden (Tabelle 32).

3.2.2 UV-vis-Spektroskopie

Aufgereinigtes CrChR2 weist eine ausgeprägte Feinstruktur auf. Auf Basis der zweiten Ableitung lassen sich drei zugrunde liegende elektronische sowie vibronisch-gekoppelte elektronische Übergänge bei 415, 445 und 480 nm extrahieren, wobei der Übergang des Schwingungsgrundzustands (ν_0') des elektronischen Grundzustands (S_0) in sein Pendant im ersten angeregten Zustand (ν_0) die größte Übergangswahrscheinlichkeit inne hat (Abbildung 25A, B). Die Energiedifferenz zwischen den Schwingungsniveaus von S_1 entsprechen der Bandenlage der ethylenischen C=C-Streckschwingung des Retinal-Chromophors ($\nu_s(\text{C}=\text{C}) = 1540 - 1550 \text{ cm}^{-1}$) (Ritter *et al.* 2008; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013).

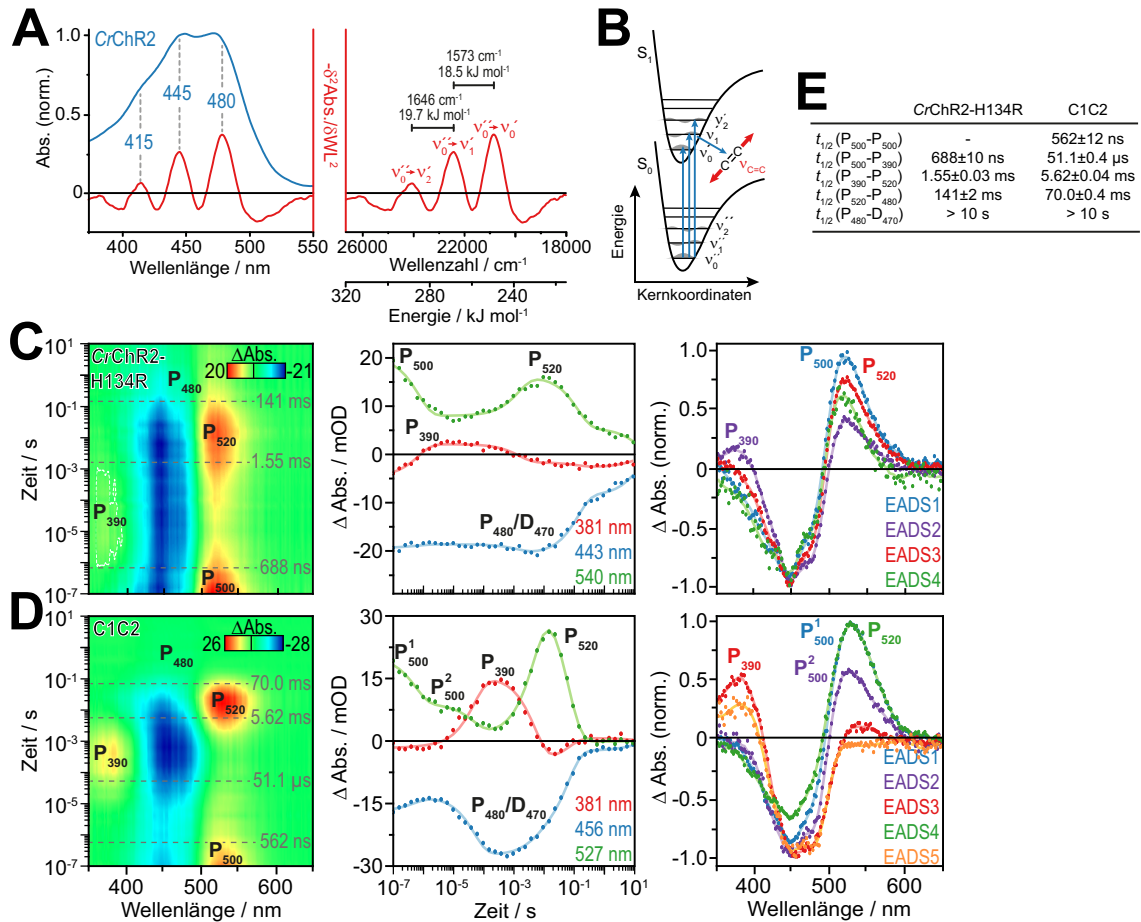


Abbildung 25: UV-vis-Spektroskopie von CrChR2(-H134R) und C1C2. **A)** Chromophorabsorption von CrChR2 (blau, links) und die zweite Ableitung des Spektrums (rot, links, geglättet mit Savitzky-Golay: 50 Punkte, Polynom fünften Grades). Die Banden wurden konkreten elektronischen sowie vibronisch-gekoppelten elektronischen Übergängen zugeordnet (rechts). Abstände der einzelnen Niveaus sind als Energiewert bzw. Wellenzahl notiert. Die Energiedifferenz der einzelnen Übergänge entspricht in vernünftiger Übereinstimmung Vibrationen der C=C-Doppelbindungen des Retinal-Cofaktors in CrChR2. **B)** Vereinfachtes Schema der elektronischen Promotion und Zustandekommen der Feinstruktur. Nach der Intensitätsverteilung der Banden der zweiten Ableitung, scheint der Übergang vom Schwingungsgrundzustand v_0'' des elektronischen Grundzustands (S_0) in sein entsprechendes Pendant (v_0') im ersten angeregten Zustand (S_1) am wahrscheinlichsten zu sein. Transiente UV-vis-Spektroskopie von CrChR2-H134R (**C**) und C1C2 (**D**) in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. Proben mit einer optischen Dichte von $A_{\text{Chrom}} = 0.45 - 0.48$ wurden mit kurzen blauen Laserpulsen angeregt (460 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 15.38 mHz) und induzierte Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 100 ns und 10 s verfolgt. Spektren aus 20 Zyklen über den gesamten Zeitbereich wurden gemittelt und nach SVD-Rekonstruktion einer globalen Analyse mit vier (C) oder fünf (D) Komponenten unterzogen. Normierte EADS (engl. *evolution-associated difference spectra*, rechts) und deren Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, gestrichelte Linien, links) sind illustriert. Absorptionsänderungen bei bestimmten Wellenlängen sind dargestellt (Mitte). Es sind die SVD-rekonstruierten Daten (Punkte) sowie der globale Fit (Linien) gezeigt. **E)** Zusammenfassung der $t_{1/2}$ -Werte aus C und D. Protein wurde von Christina Schnick unter Anleitung von Dr. Katja Stehfest (beide AG Hegemann, HU Berlin) aus *P. pastoris* exprimiert. Messungen und Datenprozessierung wurden von Benjamin Krause durchgeführt.

Die CrChR2-H134R-Mutante ist neben dem Wildtyp die bis dato am häufigsten eingesetzte Variante in neurophysiologischen Anwendungen (Wietek & Prigge 2016), was in erster Linie an ihrer geringeren Photostrom-Inaktivierung und an verbesserter Expression in heterologen Zellen zu begründen ist (Nagel *et al.* 2005; Lin *et al.* 2009; Stehfest & Hegemann 2010). Aufgrund dessen wurde sie in dieser Arbeit als Referenz für CrChR2 zu Rate gezogen

und spektroskopisch charakterisiert. Nach Laseranregung (460 nm) wurde die spektrale Evolution von Photointermediaten zwischen 100 ns und 10 s untersucht (Abbildung 25C). Die gezeigten Konturplots repräsentieren gemittelte Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel) aus 20 Zyklen über den gesamten Zeitbereich. Um eine vollständige Rückkehr in den Dunkelizustand zu gewährleisten, wurde zwischen jedem Spektrum eine Dunkelphase von 60+5 s eingeräumt.

Bei der maximalen Zeitauflösung von 100 ns ist bereits ein im Vergleich zum Dunkelizustand ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, D_{470}) rot-verschobenes Intermediat (P_{500}) zu detektieren. P_{500} sowie alle folgenden transienten Photoprodukte sind trotz etwaiger spektraler Unterschiede in Analogie zum Wildtyp (Ritter *et al.* 2008) benannt. Die initiale Photoisomerisierung von (hauptsächlich) all-*trans*- nach 13-*cis*-Retinal sowie die Entstehung von P_{500} sind schneller als die Zeitauflösung und konnten deswegen nicht beobachtet werden. P_{500} wandelt sich mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 688 \pm 10 \text{ ns}$ in eine schwach ausgeprägte UV-Spezies um (P_{390}), welche aufgrund der großen hypsochromen Farbverschiebung höchstwahrscheinlich eine deprotonierte RSB trägt. Die anschließende Reprotonierung der RSB ($t_{1/2} = 1.55 \pm 0.03 \text{ ms}$) korreliert mit der Bildung einer weiteren bathochromen Spezies (P_{520}). Mit $t_{1/2} = 141 \pm 2 \text{ ms}$ geht P_{520} in einen Zustand über, welcher spektral nur schwer von D_{470} zu unterscheiden ist (P_{480}). Resonanz-Raman-Spektroskopie (Radu *et al.* 2009) sowie die ähnliche spektrale Signatur von P_{480} und D_{470} legen eine vergleichbare Geometrie des Retinal-Cofaktors nahe. Infolgedessen könnte es sich bei P_{480} um eine bereits reisomerisierte all-*trans*-Spezies handeln. Abschließend erfolgt die Repopulation von D_{470} mit einer Zeitkonstante von $> 10 \text{ s}$.

Im Vergleich zum Wildtyp (Ritter *et al.* 2008; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013) ist die Formierung von P_{390} in H134R ca. 15 - 35fach beschleunigt und der Zerfall von P_{520} 14fach verlangsamt, wohingegen die Bildung von P_{520} nahezu unverändert ist. Ein langsamerer Photozyklus in der H134R-Mutante äußerte sich auch in einer zweifach retardierten Kanalschließung in elektrophysiologischen Messungen (Nagel *et al.* 2005; Lin *et al.* 2009).

Im Gegensatz zu CrChR2-H134R (*cf.* Abbildung 25C) zerfällt das homologe P_{500} in C1C2 mit zwei Zeitkonstanten ($t_{1/2} = 562 \pm 12 \text{ ns}$ & $51.1 \pm 0.4 \mu\text{s}$) (Abbildung 25D). Dieser Befund suggeriert die Präsenz zweier früher Intermediate und wurde auf Basis von Tieftemperatur-Raman-Spektren bereits für C1C2 postuliert (Bruun *et al.* 2015). P_{390} wandelt sich mit $t_{1/2} = 5.62 \pm 0.04 \text{ ms}$ in das reprotonierte P_{520} um, welches wiederum mit $t_{1/2} = 70.0 \pm 0.4 \text{ ms}$ nach P_{480} übergeht. Der Dunkelizustand D_{470} wird innerhalb des Messzeitraums von 10 s nicht vollständig restauriert. Im Vergleich zu CrChR2 (Ritter *et al.* 2008; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013) sind alle zugrunde liegenden Protontransferprozesse in C1C2 ca. 2 - 7fach verlangsamt. Die Reaktionskonstanten von CrChR2-H134R und C1C2 sind in Abbildung 25E zusammengefasst.

3.2.3 pH-Abhängigkeit

Im Folgenden wurde die pH-Abhängigkeit von rekombinantem CrChR2-H134R und C1C2 in einem breiten pH-Bereich (\sim pH 3.3 - 11.7) untersucht (Abbildung 26). Das UV-vis-Spektrum von CrChR2-H134R zeigt dabei eine sehr geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums von 448 nm bei pH 5.2 (D₄₄₈) nach 445 nm bei pH 9.2 (D₄₄₅) (Abbildung 26A). Mit sinkender H⁺-Konzentration nimmt die Chromophorbande zugunsten zweier UV-Spezies bei 382 nm (D₃₈₂) und 367 nm (D₃₆₇) sukzessive ab. Beide UV-Spezies stehen in einem pH-abhängigen Gleichgewicht, wobei stark alkalische Bedingungen das zu kürzeren Wellenlängen verschobene D₃₆₇ präferieren. Bei einem pH von 11.56 liegt der gesamte Photorezeptor in der UV-Spezies vor.

pH-Titrationen geben Aufschluss über pK_s-Werte von Protonierungsreaktionen von Aminosäuren, welche einen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die Chromophorabsorption haben. Die gängigste Methode bedient sich dabei der Korrelation des pH-Werts mit dem Absorptionsmaximum (Methode 1). Trotz der geringen pH-induzierten Verschiebungen des Absorptionsmaximums lassen sich zwei Übergänge mit pK_s-Werten von 7.96 ± 14.92 ($\Delta\lambda_{\max} = 2$ nm) und 9.88 ± 0.03 ($\Delta\lambda_{\max} = 2$ nm) für CrChR2-H134R bestimmen (Abbildung 26C, i). Alternativ lassen sich (De-)Protonierungsreaktionen über die spektralen Änderungen der UV-vis-Spektren innerhalb der Messreihe annähern (Methode 2). Die gemessenen UV-vis-Spektren wurden auf die Chromophorabsorption normiert und Differenzspektren (sauer minus alkalisch) berechnet (Abbildung 26A, Einschub). Die extrahierte pH-Titrationskurve lässt sich gut mit drei sigmoidalen Funktionen fitten und ergibt dementsprechend drei pK_s-Werte (4.15 ± 0.13 , 7.93 ± 0.12 & 9.88 ± 0.05) (Abbildung 26C, ii). Bemerkenswerterweise, weil kontraintuitiv, ist eine leichte Blauverschiebung auch bei stark sauren Bedingungen zu beobachten. Bis auf den sauren Übergang bei pH ~ 4 liefern beide Methoden nahezu identische Werte, dennoch scheint Methode 2 aufgrund des geringeren Fehlers die zuverlässigere Auswertform zu sein.

Um zu überprüfen, ob das „Ausbleichen“ reversibel abläuft, wurde der pH-Wert im Anschluss an die erste Messreihe wieder reduziert. Obwohl die Azidifizierung D₃₈₂ (eigentlich $\lambda_{\max} = 391$ nm) sukzessive restauriert, bleibt die Bildung einer distinkten Chromophorbande im blauen Spektralbereich aus. Die Protochromie der UV-Spezies ist nicht für freies all-*trans*-Retinal konserviert, welches neben einer graduellen Reduktion der Absorption nur die Formierung eines Nebenprodukts ($\lambda_{\max} = 298$ nm) im alkalischen pH-Milieu zeigt (Abbildung 26D, Einschub). Infolgedessen sind D₃₆₇ und D₃₈₂ keine pH-abhängigen Isoformen von dissoziiertem Retinal, sondern der Cofaktor ist zumindest partiell im Protein gebunden. Die Hydrolyse der RSB-Bindung kann weitgehend ausgeschlossen werden, da ein gebundenes all-*trans*-Retinal ohne kovalente Verknüpfung zum Apoprotein eine deutliche Feinstrukturierung der UV-Bande aufweist (cf. Abbildung 27E, Abbildung A 5 & Abbildung A 6A, B). Am besten lässt sich die starke hypsochrome Verschiebung von D_{448/445} nach D₃₈₂/D₃₆₇ durch die Deprotonierung der RSB innerhalb des gefalteten Proteins erklären, da die elektrostatische Interaktion zwischen geladenen Gegenionen und der RSBH⁺ wegfällt. Da analoge UV-Spezies ($\lambda_{\max} = 365$ nm bei

pH 11.8 & $\lambda_{\max} = 402$ nm bei pH 9.0) auch für BR unter alkalischen Bedingungen detektiert werden (Marti, Rösselet *et al.* 1991), erscheint die Zuordnung plausibel. Für den Dunkelzustand von CrChR2-H134R lässt sich die Deprotonierung der RSB mit einem pK_s -Wert von 10.69 ± 0.04 bilanzieren (Abbildung 26C, iii) und liegt damit in guter Übereinstimmung zum Kanalarhodopsin P₅ChR2 ($pK_s(\text{RSBH}^+) \sim 10.5$) (Govorunova *et al.* 2013).

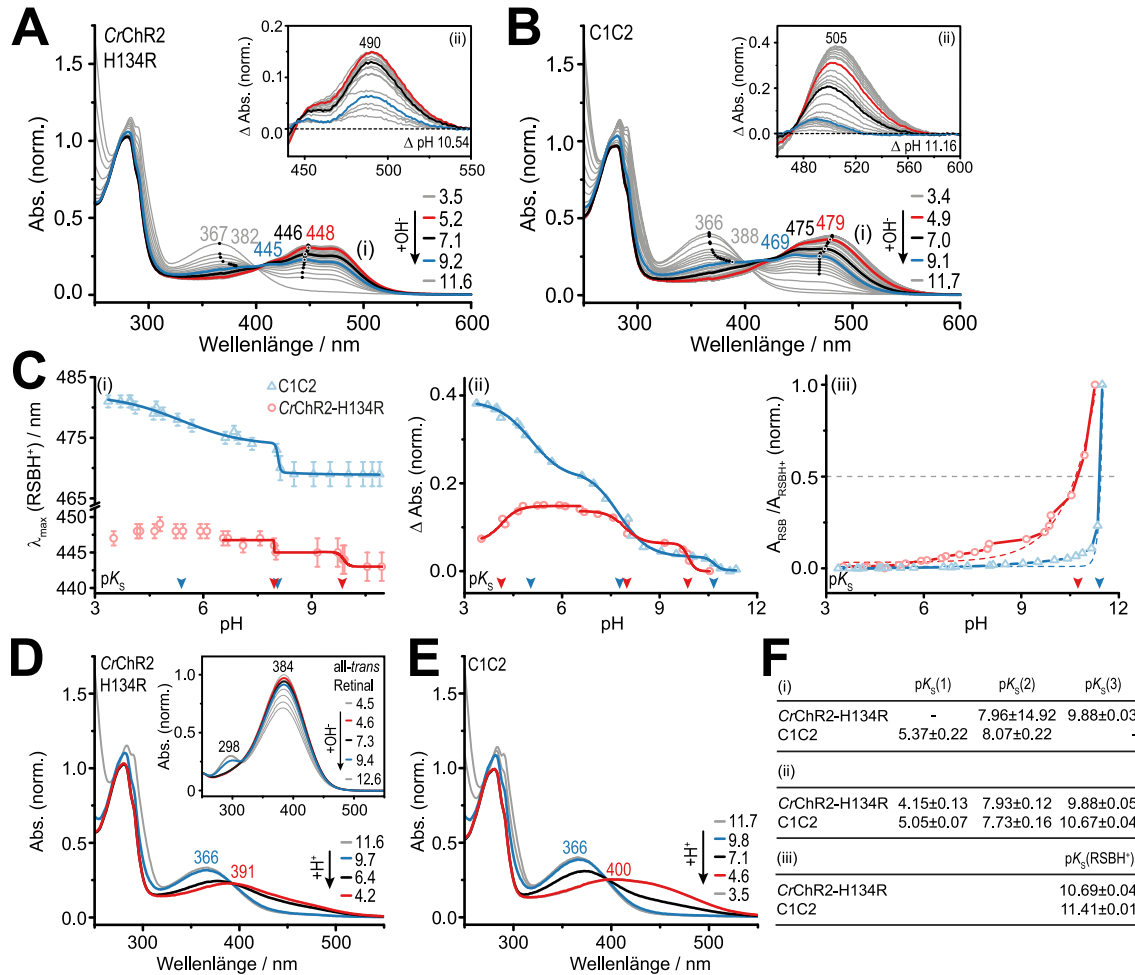


Abbildung 26: pH-Abhängigkeit von CrChR2-H134R und C1C2. UV-vis-Absorptionsspektren von CrChR2-H134R (A, pH 3.52 \rightarrow 11.56) und C1C2 (B, pH 3.37 \rightarrow 11.66) in Titrationspuffer (jeweils 10 mM Citrat, BTP & CAPS, 100 mM NaCl & 0.03 % (w/v) DDM). Maxima der RSBH⁺- (farbig) und RSB-Spezies (grau) sind skizziert (schwarze Kreise) und für ausgewählte pH-Werte dargestellt. Differenzspektren (pH X minus pH 10.54 (A) bzw. 11.16 (B)) wurden berechnet (Einschübe). C) Titrationskurven nach Methode 1 (i, pH *vs.* Absorptionsmaxima der RSBH⁺), Methode 2 (ii, pH *vs.* Absorptionsänderungen bei 490 nm (CrChR2-H134R) bzw. 505 nm (C1C2)) und Deprotonierung der RSBH⁺ (iii, normiertes Verhältnis A_{367}/A_{448} (CrChR2-H134R) bzw. A_{365}/A_{481} (C1C2)). Übergänge (pK_s -Werte) sind illustriert (Pfeile). UV-vis-Spektren von CrChR2-H134R (D, pH 11.56 \rightarrow 4.19) und C1C2 (E, pH 11.66 \rightarrow 3.54) nach alkalischer Deprotonierung der RSB in A bzw. B. UV-vis-Spektren von all-*trans*-Retinal in Titrationspuffer (pH 4.54 \rightarrow 12.61) (D, Einschub). F) Zusammenfassung der ermittelten pK_s -Werte. Rekombinantes Protein wurde von Christina Schnick unter Anleitung von Dr. Katja Stehfest (beide AG Hegemann, HU Berlin) aus *P. pastoris* exprimiert. pH-Titrations inkl. Auswertung wurde von Benjamin Krause durchgeführt.

Eine Deprotonierung der RSB wird auch im Photozyklus von CrChR2-H134R ($P_{500} \rightarrow P_{390}$, cf. Abbildung 25C) beobachtet, allerdings ist diese nur transient und es erfolgt die

Reprotonierung im späteren Verlauf ($P_{390} \rightarrow P_{520}$, cf. Abbildung 25C). Im Gegensatz dazu scheint die pH-katalysierte Dissoziation des RSB-Protons bei $\text{pH} \geq 11$ für CrChR2-H134R aber permanent zu sein. Das mag zum einen am Ausbleiben der durch Isomerisierung verursachten strukturellen Änderungen des Proteinrückgrats liegen oder/und an irreversiblen Deprotonierungsreaktionen innerhalb des Proteins, welche zu einer partiellen Denaturierung führen. Die hypsochrome Farbverschiebung von D_{382} nach D_{367} könnte durch die Deprotonierung eines zur RSB in der Nähe befindlichen Restes wie z.B. eines der Gegenionen erklärt werden. Interessanterweise zeigt CrChR2-H134R mit deprotonierter RSB eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 25 \text{ nm}$), während der Photorezeptor mit RSBH^+ nahezu pH-insensitiv ist ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 3 - 5 \text{ nm}$). Bei Änderung des elektrostatischen Potentials, d.h. Deprotonierung der RSB, können sich auch die pK_s -Werte der Gegenionen ändern. Während der pK_s -Wert der(s) protonierbaren Reste(s) für CrChR2-H134R mit RSBH^+ unter 4 liegt, wird er durch die Deprotonierung der RSB auf einen Wert > 4 angehoben. Infolgedessen führt eine pH-induzierte Protonierung eines bzw. mehrerer Reste in D_{367} zwischen $\text{pH} 11.56$ und 4.19 zu der Bildung des rot-verschobenen D_{382} . Auf Basis der vorherigen Resultate kann die Abnahme der Chromophorabsorption des Holoproteins bei geringen Protonenkonzentrationen, neben einem verringerten Extinktionskoeffizienten des Cofaktors, auch der sukzessiven Deprotonierung der RSB zugeschrieben werden.

Rekombinantes C1C2 zeigt eine moderate Protochromie mit einer Verschiebung von $\lambda_{\text{max}} = 479 \text{ nm}$ bei $\text{pH} 4.9$ nach $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$ bei $\text{pH} 9.1$ (Abbildung 26B). Während sich die UV-vis-Spektren von CrChR2-H134R und C1C2 im neutralen und basischen pH-Milieu stark ähneln, nimmt die Amplitude des längerwelligen Maximums von C1C2 im Säuren deutlich zu und die Feinstruktur ist weniger ausgeprägt. Wie für CrChR2-H134R ist unter alkalischen Bedingungen die Bildung der deprotonierten RSB-Spezies D_{366}/D_{388} zu detektieren, jedoch findet die Deprotonierung erst mit einem pK_s -Wert von 11.41 ± 0.01 statt (Abbildung 26C, iii).

Während die pH-Titrationen nach Methode 1 (pH vs. λ_{max}) zwei pK_s -Werte von 5.37 ± 0.22 ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 7 \text{ nm}$) und 8.07 ± 0.22 ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 5 \text{ nm}$) liefert, sind nach Methode 2 (pH vs. Absorptionsänderungen bei 505 nm) drei Übergänge mit pK_s -Werten von 5.05 ± 0.07 , 7.73 ± 0.16 und 10.67 ± 0.04 zu verzeichnen (Abbildung 26C, i, ii). In Analogie zu CrChR2-H134R konnte auch für C1C2 nach Methode 2 eine weitere Komponente extrahiert werden und die assoziierten Fehler sind kleiner. Nach quantitativer Deprotonierung der RSB (D_{366}) bei $\text{pH} 11.66$ kann durch graduelle Azidifizierung die Formierung der rot-verschobenen Spezies P_{388} ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$) induziert werden (Abbildung 26E). Im Gegensatz zu CrChR2-H134R zeigt P_{388} eine größere Halbwertsbreite und eine leichte Schulter bei ca. 450 nm bei $\text{pH} 4.6$. Es wurde für BR postuliert, dass die Deprotonierung der RSB bei kurzer Inkubationszeit im stark Basischen und umgehender Neutralisation reversibel sei (Marti, Rösselet *et al.* 1991). Die Schulter bei 450 nm von C1C2 könnte daher durch eine partielle Reprotonierung der RSB im Säuren erklärt werden. Trotz der gewissen Abweichungen der ermittelten Werte (i & ii vs. iii, Abbildung 26F) kann der spektrale Übergang im stark Alkalischen mit der Deprotonierung der RSB korreliert werden.

3.3 Charakterisierung von ReaChR

3.3.1 Expression und Chromophorrekonstitution

ReaChR wurde in Analogie zu C1C2 (*cf.* Abbildung 24) in HEK293T-Zellen exprimiert und anschließend *via* Immunopräzipitation aufgereinigt. Im Western Blot der unbehandelten Probe wurden zwei Banden bei 35 und 37 kDa sowie ein Schatten im höhermolekularen Bereich detektiert (Abbildung 27C). Die kleine Diskrepanz zum berechneten Molekulargewicht von 39.6 kDa kann partiell durch die Abspaltung eines Signalpeptids (23 AS, 2.3 kDa, SignalP) erklärt werden. Der höhermolekulare Schatten sowie das doppelte Bandenmuster suggerieren eine unvollständige und heterogene Glykosylierung (Reeves *et al.* 2002; Ernst *et al.* 2008). Auf Basis von NetNGlyc lassen sich zwei extrazelluläre Glykosylierungsstellen (N-X-S/T, X \neq P) an N62 und N83 vorhersagen. Im Gegensatz zu C1C2 (*cf.* Abbildung 24C) ist unter den analogen Expressionsbedingungen kein Dimer zu beobachten. Das Bandenmuster ist tolerant gegenüber thermischer Belastung (15 min, 90 °C), verändert sich allerdings nach PNGaseF-Verdau. Der diffuse Schatten sowie die Bande bei 37 kDa verschwinden zugunsten der Bande bei 35 kDa, welche daher nichtglykosyliertem Protein zugeordnet werden kann. Eine weitere niedermolekulare Bande bei 32 kDa entstand und könnte einem kompakteren (Ent-)Faltungsprodukt oder einer N-terminal verkürzten Variante entsprechen, wobei eine Protolyse durch wirtseigene Proteasen aufgrund der Verwendung von Proteaseinhibitor während der Aufreinigung ausgeschlossen werden kann. Auch ein zur Autoprotolyse tendierendes DP-Motiv ist in der Primärsequenz von ReaChR nicht vorhanden.

Die Ausbeute von rekombinantem ReaChR war unter Standard-Transfektionsbedingungen (Lipofectamine & PLUS-Reagenz) mit 25.11 μg / 55 cm² ca. 2.5fach größer gegenüber CrChR2 (10.73 μg / 55 cm²) (*cf.* Tabelle 32). Die besseren Expressionseigenschaften im Vergleich zu CrChR2 könnten an einem effizienteren co- bzw. post-translationalen Proteintransport aufgrund des CrChR1-Signalpeptids (1 - 23 AS) liegen.

Um die Expression auch bezüglich der Reagenzkosten zu optimieren, wurden kostengünstigere Alternativen zum hochpreisigen Transfektionsreagenz Lipofectamine evaluiert. Das preiswerte polykationische Polyethylenimin (PEI) lieferte moderate (11.66 μg / 55 cm²), aber stark fluktuierende Ausbeuten (Abbildung 27D). Dabei schien die Temperatur des Ansatzes einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu haben. Als robuste und günstigere Alternative produzierte TurboFect hohe Ausbeuten (23.25 μg / 55 cm²), wenn auch etwas geringer als Lipofectamine, war leicht zu handhaben und wurde deswegen fortan für die Expression verwendet.

Neben unterschiedlichen Transfektionsmethoden wurde sich auch einer Fusionsstrategie mit einem N-terminalen Auxiliar bedient. Die β -Untereinheit der H⁺,K⁺-ATPase aus dem Magen von *Rattus norvegicus* (β -HK, 1 - 105 AS) (Shull 1990) erhöhte die Membranlokalisation von heterolog exprimiertem BR und führte zu einer zehnfachen Steigerung der Expression in HEK293-Zellen (Geibel *et al.* 2001). Weiterhin wurde die β -HK, welche aus einer transmembranen α -Helix und ausgedehnten Loopregionen besteht, zur Colokalisierung eines

BR-*CrChR2*-Tandems eingesetzt (Kleinlogel, Terpititz *et al.* 2011). Wie in den Referenzen wurde die β -HK N-terminal mit ReaChR fusioniert (TEV-Proteaseschnittstelle zwischen β -HK und ReaChR) und in HEK293T exprimiert. Nach der Aufreinigung war im UV-vis-Spektrum aber nur eine geringe Menge an Protein (A_{280}) ohne Chromophor zu verzeichnen (nicht gezeigt). Es bleibt unklar, ob mit diesem Resultat dem positiven Effekt der β -HK in Gänze widersprochen werden kann oder ob das Ausbleiben des „Erfolgs“ eher dem amphipathischen Charakter des Fusionskonstrukts (ausgedehnte polare Loops der β -HK *vs.* hydrophobe transmembrane Helices des ChR) und der damit erschwerten Solubilisierung aus der Lipidmembran geschuldet ist. Da die Aufreinigung eines analogen β -HK-Chrimson-Fusionskonstrukts auch kein funktionales Protein (ohne Chromophorabsorption) erbrachte (*cf.* Abbildung A 8A), wurde von der Verwendung der β -HK als expressionssteigerndes Auxiliar für ChRs abgesehen.

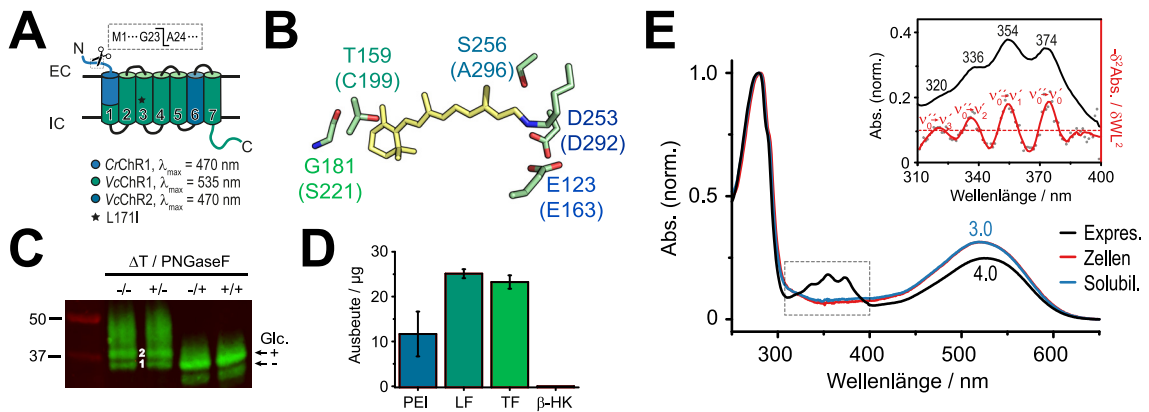


Abbildung 27: Expression von ReaChR in HEK293T-Zellen. **A)** Skizzierter Aufbau des rotlichtaktivierbaren ChR ReaChR (Chimäre aus *CrChR1* (1 - 94 AS), *VcChR1* (H1 - 5, 50 - 201 AS & H7, 230 - 300 AS) & *VcChR2* (H6, 202 - 229 AS), L171I, 345 AS, Protein-ID: AGT48260). Das Signalpeptid und dessen Schnittstelle wurden mit SignalIP vorhergesagt. **B)** Molekulare Unterschiede zwischen *CrChR2* und ReaChR (*in Klammern*). Strukturmodell auf Basis der C1C2-Kristallstruktur (PDB: 3ug9). **C)** Western Blot (Antikörper: 1) Hybridoma 1D4, 2) *anti*-Maus IRDye 800CW) nach semi-denaturierender SDS-PAGE von isoliertem Protein (40 ng). Banden des Proteinmarkers in kDa. ΔT , Inkubation für 15 min bei 90 °C; PNGaseF, Behandlung mit Peptidyl-N-Glykosidase F; Glc., Glykosylierung; M_w (ReaChR) = 39.6 kDa. **D)** Ausbeuten von ReaChR auf Basis der Chromophorabsorption mit $\epsilon_{chrom} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (*cf.* Abbildung 29) nach Transfektion mit Polyethylenimin (PEI), Lipofectamine und PLUS-Reagenz (LF), TurboFect (TF) und mit N-terminaler β -HK (β -Untereinheit der H^+, K^+ -ATPase aus dem Magen von *Rattus norvegicus*, 1 - 105 AS) wurden verglichen. **E)** UV-vis-Absorptionsspektren von rekombinantem Holoprotein in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM nach Zugabe von all-*trans*-Retinal während der Expression (*schwarz*), zu den geernteten Zellen (*rot*) oder während der Solubilisierung (*blau*). Im Einschub ist die Feinstruktur der UV-Bande sowie dessen zweite Ableitung (*grau*: Rohdaten, *rot*: geglättet, Savitzky-Golay: 30 Punkte, Polynom fünften Grades) vergrößert dargestellt. Die (schwingungsgekoppelten) elektronischen Übergänge wurden den zugrunde liegenden Banden zugeordnet.

Im Gegensatz zu dem ungewöhnlichen Aktionsspektrum aus Lin *et al.* (2013) zeigten die UV-vis-Absorptionsmessungen von isoliertem ReaChR ein rhodopsintypisches Spektrum mit einem Maximum bei ca. 525 nm und einer Halbwertsbreite von ~ 150 nm (Abbildung 27E). Die spektralen Eigenschaften zeigen große Übereinstimmung zum parentalen *VcChR1* (Zhang *et al.* 2008; Kianianmomeni *et al.* 2009) sowie zu später publizierten Aktionsspektren von ReaChR (Dawydow *et al.* 2014; Klapoetke *et al.* 2014). ReaChR ist gegenüber rekombinantem C1V1-25A

um ca. 10 nm in den längerwelligen Spektralbereich verschoben und weist eine zehnfach höhere Expressionsrate auf (cf. Abbildung A 3).

Überraschenderweise zeigt rekombinantes ReaChR neben der Chromophorbande auch eine feinstrukturierte UV-Bande mit einem Hauptmaximum bei 354 nm und Nebenmaxima bei 374 und 336 nm sowie einer Schulter bei ca. 320 nm (Abbildung 27E). Die einzelnen Banden konnten konkreten schwingungsgekoppelten elektronischen Übergängen zugeordnet werden, wobei der Übergang aus dem elektronischen und vibronischen Grundzustand (ν_0) in den ersten vibronischen Zustand des elektronisch angeregten Zustands (ν_1) die höchste Intensität aufweist. Solch eine feinstrukturierte UV-Bande wurde für das langsame CrChR2-C128T nach dreiminütiger Belichtung beobachtet und einem sehr langsamen Seitenprodukt (P353) des Photozyklus zugeordnet. Auf Basis von UV-vis-, Fluoreszenz- und Resonanz-Raman-Messungen wurde P353 einer deprotonierten *cis*-Retoretinyl-Spezies (5x C=C-Bindungen) (Stehfest *et al.* 2010) bzw. einem gebundenem all-*trans*-Retinal mit hydrolysierter RSB (Bruun *et al.* 2011) zugrunde gelegt. Ein transients Bindungsbruch der RSB scheint in Homologie zu den azyklischen Säugetierrhodopsinen (Kiser *et al.* 2014) aber wahrscheinlicher und könnte in der C128T-Mutante durch die polare Hydroxylgruppe des eingeführten Threonins 128 katalysiert werden. Im Gegensatz zu der C128T-Mutante, in welcher die RSB mit einer Zeitkonstante von $\tau = 90$ s (Stehfest *et al.* 2010) restauriert wird, ist der vermutete Bindungsbruch in ReaChR (thermisch) irreversibel. Auch nach Belichtung mit UV-Licht (30 - 60 s, 380 nm) war keine Zunahme des Chromophors bzw. Abnahme der UV-Bande zu beobachten (nicht gezeigt), d.h. ein Anteil des isolierten Proteins hat einen lichtinsensitiven Cofaktor inkorporiert und ist damit photoinaktiv.

Es stellt sich die Frage, welche molekularen Determinanten (in ReaChR) die beobachtete Reaktion nach Retinal-Zugabe während der Expression begünstigen, da sie weder in den Wildtyp-Proteinen von C1C2, CoChR, CrChR2, Chronos noch in (Cs)Chrimson beobachtet werden konnten (cf. Abbildung 48B & Abbildung A 8). Intuitiv würde man Änderungen der elektronischen Situation an der RSB vermuten, welche die RSB-Bindungshydrolyse entsprechend katalysieren könnte. Jedoch sind die beiden Gegenionen im Allgemeinen konserviert (cf. Abbildung 13) und es scheint eher an proteinspezifischen Gegebenheiten zu liegen. Als augenscheinlichster Unterschied innerhalb der Retinal-Bindetasche fällt die T159C-Mutation in H4 gegenüber CrChR2 (C199 in ReaChR) auf (Abbildung 27B). Studien an CrChR2 demonstrierten eine Tendenz zur Aggregation in Abwesenheit des Cofaktors. Die Substitution von Threonin 159 gegen ein Cystein, welches in ReaChR natürlich konserviert vorliegt, führte in CrChR2 zwar zu einer erhöhten Bindungsaffinität des Apoproteins zum Cofaktor, dennoch war kein grundsätzlicher Stabilitätsgewinn zu verzeichnen (Ullrich *et al.* 2013). Weitere Unterschiede sind am β -Ionon-Ring (CrChR2-G181S) sowie in der Nähe der RSB (CrChR2-S256A) aufzufinden, jedoch ist ein Einfluss dieser Reste bisher ausschließlich auf die Farbverschiebung (cf. Kapitel 1.3.17) und nicht auf die RSB-Hydrolyse nachgewiesen worden. Bemerkenswerterweise ließ sich die gleiche Feinstruktur permanent in der DC-Paar Mutante C108T von CoChR (CrChR2-C128T) (cf. Abbildung A 6A) sowie in der „Gegenionenmutante“

M140D (C₇ChR2-E123) von Chronos identifizieren (cf. Abbildung A 5), was wiederum für ein allgemeineres Phänomen von ChRs und gewissen Mutanten spricht.

Um eine metabolische bzw. enzymatische Modifikation des Retinal-Moleküls während der Expression im Wirt zu verhindern, wurde nur das Apoprotein exprimiert und zu einem späteren Zeitpunkt rekonstituiert. Diese Strategie ist üblich für tierische Rhodopsine wie bovines Rhodopsin (bR) (Oprian *et al.* 1987), setzt aber eine gewisse Stabilität des Apoproteins voraus. ApoReaChR wurde im Rahmen der Arbeit zu vier verschiedenen Zeitpunkten mit seiner prosthetischen Gruppe assembliert: 1) Co- bzw. post-translational (Standard) 2) nach der Zellernte 3) während der Solubilisierung 4) im aufgereinigten Zustand. Bemerkenswerterweise konnte bei Protokoll 2) und 3) im Vergleich zur Standardprozedur 1) ein deutlich verbessertes Protein-zu-Chromophor-Verhältnis (A_{280}/A_{Chrom}) und das Ausbleiben der UV-Spezies erzielt werden (Abbildung 27E), was eine partielle RSB-Hydrolyse *in-vivo* innerhalb des Expressionszeitraums von 36 - 48 h suggeriert. Es wurden A_{280}/A_{Chrom} von ≥ 3.0 erzielt, wobei aufgrund der sehr hohen Spezifität und Affinität der 1D4-basierten Aufreinigungsmethode eine Rekonstitution bei einem Verhältnis von 3.0 als quantitativ gewertet wurde.

Durch sequentielle Zugabe von substöchiometrischen Mengen an all-*trans*-Retinal zu rekombinantem ApoReaChR ließ sich eine Rekonstitutionseffizienz von ca. 75 % erreichen, wobei in Anwesenheit von ~ 0.7 Äquivalenten bereits eine initiale Sättigung zu beobachten war (Abbildung 28A). Auch überstöchiometrische Dosen (≥ 1.0 Äquiv.) erzielten keine höhere Einbaurrate, sondern führten nur zur Anreicherung von freiem Retinal ($\lambda_{\text{max}} = 390$ nm). Eventuell sind die verbleibenden 25 % des Proteins während der Proteinpräparation aggregiert bzw. fehlgefaltet und inhibieren so die Bindung der prosthetischen Gruppe. Das scheint plausibel, da die Cofaktor-Bindung einen substanziellen Stabilitätsgewinn des Proteins erzielt, z.B. 17 kcal mol⁻¹ für BR (Curnow & Booth 2010). Nichtsdestotrotz weist ApoReaChR eine beachtliche Stabilität auf. Die Bildung des Holoproteins fand instantan statt, zumindest schneller als die Zeitauflösung des Cary 300-Photospektrometers und ließ sich demzufolge mit stationärer UV-vis-Spektroskopie nicht nachverfolgen. Über A_{280}/A_{Chrom} wurde die Rekonstitution des Apoproteins durch die im fötalen Kälberserum (FKS) des Mediums enthaltenen Retinoide auf ca. 10 % geschätzt.

Die gesammelten Erkenntnisse wurden genutzt um das ESR-aktive N-Oxid-Retinal in ReaChR zu inkorporieren. N-Oxid-Retinal (Abbildung 28B, ii) trägt ein ungepaartes Elektron am Sauerstoff und wurde für ESR-Messungen an BR eingesetzt (Crouch *et al.* 1981; Eliash *et al.* 2001; Eliash *et al.* 2013). Als erstes wurde isoliertes ApoReaChR mit stöchiometrischen Mengen des artifiziellen Liganden versetzt und die Bildung des Pigments spektroskopisch beobachtet (Abbildung 28B). Innerhalb von wenigen Minuten war eine zum freien Cofaktor ($\lambda_{\text{max}} = 388$ nm) rot-verschobene Absorptionsbande bei 492 nm auszumachen, welche über den Beobachtungszeitraum an Amplitude zunahm. Die hypsochrome Farbverschiebung von ca. 35 nm zum Wildtyp-Protein ($\lambda_{\text{max}} = 527$ nm) ist vermutlich zum einen auf die 6-*s-cis*-Konfiguration des künstlichen Liganden und zum anderen auf die geänderte elektronische Situation der 1-Oxyl-Tetramethylpyrrolin-Kopfgruppe zurückzuführen. Das analoge Pigment in BR absorbierte bei ca. 460 nm, d.h. 90 - 110 nm blau-verschoben gegenüber dem nativen

Photorezeptor (Crouch *et al.* 1981). Die Bindungskinetik des NO-Analogons bei 20 °C war im Vergleich zur nativen prosthetischen Gruppe allerdings stark retardiert und ließ sich mit zwei Zeitkonstanten im Minutenbereich beschreiben ($\tau_1 = 3.9 \pm 0.7$ min (36 %), $\tau_2 = 28.8 \pm 2.7$ min (64 %)). Nach zweistündiger Inkubation schien das Apoprotein abgesättigt zu sein, da innerhalb einer weiteren Stunde kein Zuwachs an Chromophorabsorption zu beobachten war. Es wurde ein A_{280}/A_{Chrom} -Verhältnis von 6.3 erreicht.

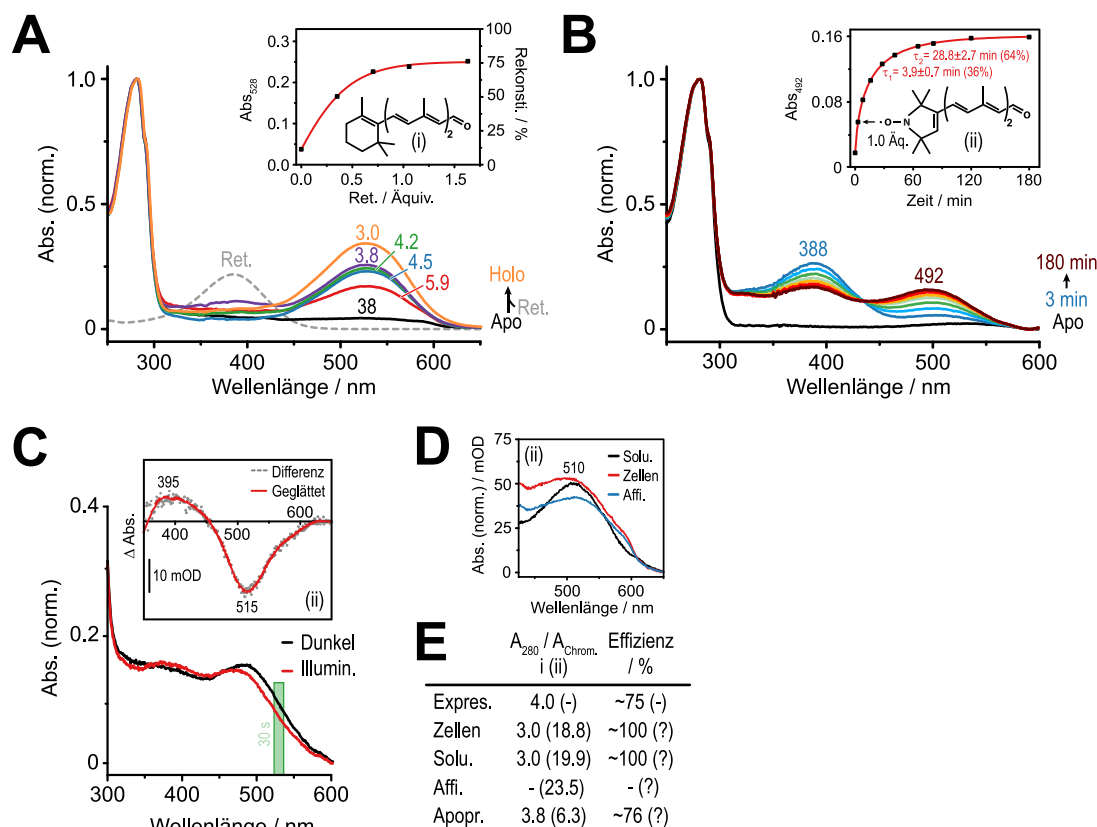


Abbildung 28: Rekonstitution von ReaChR mit all-trans- und N-Oxid-Retinal. **A)** Sequentielle Rekonstitution von aufgereinigtem Apoprotein in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM mit substöchiometrischen Mengen von all-trans-Retinal (i) bei 20 °C. Arbiträr skaliertes Spektrum von (i) in wässriger Phase (grau, cf. Abbildung A 1A). Farbige Zahlen indizieren Protein-zu-Chromophor-Verhältnis (A_{280}/A_{Chrom}). HoloReaChR-Spektrum (orange) entnommen aus Abbildung 27E. Einschub zeigt die Rekonstitutionseffizienz. Angenommen wurde eine quantitative Rekonstitution bei Erreichen von $A_{280}/A_{\text{Chrom}} = 3.0$. Datenpunkte gefittet mit sigmoideal Boltzmann-Funktion (rot). **B)** In-situ-Rekonstitution von aufgereinigtem Apoprotein mit einem Äquivalent von N-Oxid-Retinal (ii). Einschub demonstriert die Bindungskinetik des entsprechenden Holo-Proteins. τ -Werte aus biexponentiellem Fit (rot). **C)** UV-vis-Spektren (DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM) des dunkeladaptierten und belichteten (30 s, 530 nm-LED, 1×10^{20} Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) N-Oxid-ReaChR nach Dialyse. Differenzspektrum (Licht minus Dunkel, Einschub) wurde berechnet. Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte geglättet (rot, Savitzky-Golay: 30 Punkte, Polynom dritten Grades). **D)** Rekonstitution mit (ii) zu verschiedenen Zeitpunkten der Proteinisolierung. Gezeigt sind UV-vis-Spektren der Chromophorabsorption. Affi., Rekonstitution des Apoproteins während der Bindung an das 1D4-Säulenmaterial. **E)** Zusammenfassung der Rekonstitutionsexperimente mit (i) bzw. (ii).

Da der Extinktionskoeffizient des NO-BRs nicht veröffentlicht wurde, lässt sich aber keine konkrete Aussage zur Rekonstitutionseffizienz in ReaChR treffen. Wie anhand der residualen Absorption bei ca. 390 nm erkennbar, lag in der Proteinlösung noch ungebundener

Cofaktor vor. Es wurde versucht den Überschuss an freiem Retinal-Analogon durch intensives Waschen im Konzentrator zu entfernen. Trotz einer signifikanten Reduktion bei 390 nm, verblieb eine basale Absorption zwischen 325 und 425 nm bestehen.

Durch Photoaktivierung wurden lichtabhängige Reaktionen des NO-ReaChR untersucht. Nach Belichtung (30 s, 530 nm) konnte die Bildung einer UV-Spezies bei 395 nm im Differenzspektrum detektiert werden (Abbildung 28C), ein Indiz für die erfolgte lichtabhängige Deprotonierung der RSB. Um den obligatorischen finalen Waschschrift zu vermeiden und ggf. ein besseres A_{280}/A_{Chrom} -Verhältnis zu erzielen, wurde die Cofaktor-Supplementation entweder während der Solubilisierung, der Immunopräzipitation oder an den geernteten Zellen durchgeführt. In allen drei Ansätzen war eine deutlich schlechtere Komplementation zu verzeichnen ($A_{280}/A_{\text{Chrom}} = 18.8 - 23.5$, Abbildung 28E). Zusätzlich war die Chromophorabsorption ca. 20 nm in den längerwelligen Spektralbereich verschoben (Abbildung 28D).

3.3.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten

Da der Extinktionskoeffizient der Chromophorabsorption (ϵ_{Chrom}) von der Umgebung des Cofaktors abhängt, müsste dieser rein theoretisch für jedes Protein einzeln bestimmt werden. Für ReaChR wurde ϵ_{Chrom} mit zwei verschiedenen Methoden abgeschätzt. Für die erste Methode wurde eine quantitative Rekonstitution zugrunde gelegt. Anhand der Primärsequenz wurde die Anzahl der aromatischen Aminosäuren bestimmt und der theoretische Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) berechnet. Anschließend wurde die Proteinbande im UV-vis-Spektrum als Summe der Einzelspektren der aromatischen Reste (*cf.* Abbildung A 2) modelliert (Abbildung 29A). Da der Fit eine gute Übereinstimmung zum Spektrum aufwies, wurde eine homogene Probe ohne proteinogene Kontaminationen angenommen. Auf Basis dieser Korrelation konnte ein $\epsilon_{527}(\text{ReaChR})$ von $\sim 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden.

Alternativ wurde das Holoprotein einer alkalischen Hydrolyse bei pH ~ 12 unterzogen und die Konzentration des hydrolysierten Retinals spektroskopisch bestimmt (Abbildung 29B). Je nach verwendetem ϵ_{Ret} ergab sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ein ϵ_{Chrom} zwischen 31.500 und 32.800 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Ergebnisse beider Methoden liegen in der Größenordnung des Literaturwerts des grün-absorbierenden CaChR1 ($\epsilon_{518} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014), aber deutlich unter dem für CrChR1 und 2 ($\epsilon_{\text{Chrom}} = 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Beckmann & Hegemann 1991; Stehfest & Hegemann 2010) sowie BR ($\epsilon_{570} = 63.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Oesterhelt *et al.* 1973).

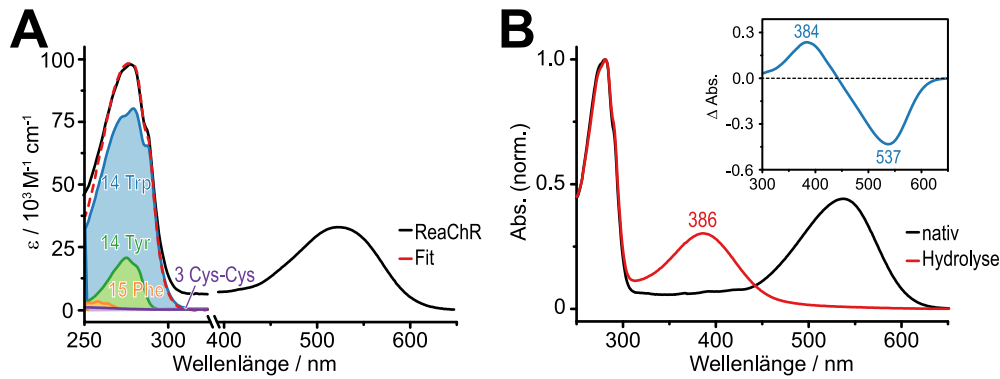


Abbildung 29: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von ReaChR. **A)** UV-vis-Spektrum von aufgereinigtem Protein in DPBS incl. 0.03 % (w/v) DDM bei pH 7.4. Absorptionsbande bei ca. 280 nm wurde gefittet als Summe der Einzelspektren der aromatischen Aminosäuren (cf. Abbildung A 2). Anzahl der jeweiligen Reste entnommen aus der Primärsequenz (1 - 345 AS, KF448069.1). Es wurde ein Dimer mit drei Disulfidbrücken in Analogie zu C1C2 angenommen (Kato *et al.* 2012). $\epsilon_{280}(\text{ReaChR}) = 99.446 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{280} = 62$ (0.5xCystin), 1.265 (Tyr) & 5.690 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Trp). Bei quantitativer Rekonstitution ($A_{280}/A_{527} = 3.0$) beträgt $\epsilon_{527}(\text{ReaChR}) \sim 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. **B)** UV-vis-Spektrum von ReaChR bei pH 4.6 (*schwarz*) und nach alkalischer Hydrolyse (*rot*) sowie das berechnete Differenzspektrum (alkalisch minus sauer, Einschub). Konzentration von freiem Retinal wurde mit $\epsilon_{382}(\text{Ret. in aq. Lsg.}) = 17.200 - 17.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Szuts & Harosi 1991) (cf. Abbildung A 1A) berechnet und ergibt $\epsilon_{\text{chrom}}(\text{ReaChR}) = 31.500 - 32.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3 pH-Abhängigkeit des Dunkelzustands

In Analogie zu *V*ChR1 (Kianianmomeni *et al.* 2009) wurden protochrome Effekte von rekombinanten ReaChR zwischen pH 1.61 und 11.43 untersucht. ReaChR zeigt eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit mit einem Absorptionsmaximum von 535 nm bei pH 5 (D_{535}) und 503 nm bei pH 9 (D_{503}) (Abbildung 30A). Die hypsochrome Farbverschiebung korreliert mit der Ausprägung einer absorptiven Schulter bei ca. 480 nm und weist große Ähnlichkeiten zu seinem parentalen Vorgänger *V*ChR1 auf (Kianianmomeni *et al.* 2009). Interessanterweise erfährt das Absorptionsmaximum von ReaChR, wie auch in *C*ChR2-H134R (cf. Abbildung 26C), bei sehr sauren Bedingungen (pH < 5) eine reverse Verschiebung zu energiereicherem Licht (Abbildung 30A, Einschub). Die pH-induzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums (Methode 1) lässt sich mit zwei bis drei sigmoidalen Funktionen approximieren, wobei ein Fit mit drei Komponenten die experimentellen Daten besser beschreibt (Abbildung 30B). Demzufolge lassen sich drei Übergänge mit pK_s -Werten von 2.84 ± 0.05 ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 4 \text{ nm}$), 6.76 ± 0.03 ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 14 \text{ nm}$) und 8.01 ± 0.19 ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 16 \text{ nm}$) extrahieren.

Abbildung 30C demonstriert die berechneten Differenzspektren nach Normalisierung auf die Chromophorabsorption (*rechts*) und die extrahierte pH-Titrationskurve (*links*, Methode 2). In der letztgenannten Darstellungsform lassen sich nur ein bis zwei Übergänge *via* Fit ausmachen, wobei auch hier der breite Übergang im pH-Bereich zwischen 5 und 11 nur unzureichend durch eine einzelne Komponente beschrieben werden kann. Die ermittelten pK_s -Werte (7.76 ± 0.03 & 8.71 ± 0.10) liegen ca. eine pH-Einheit über den Werten der ersten Methode.

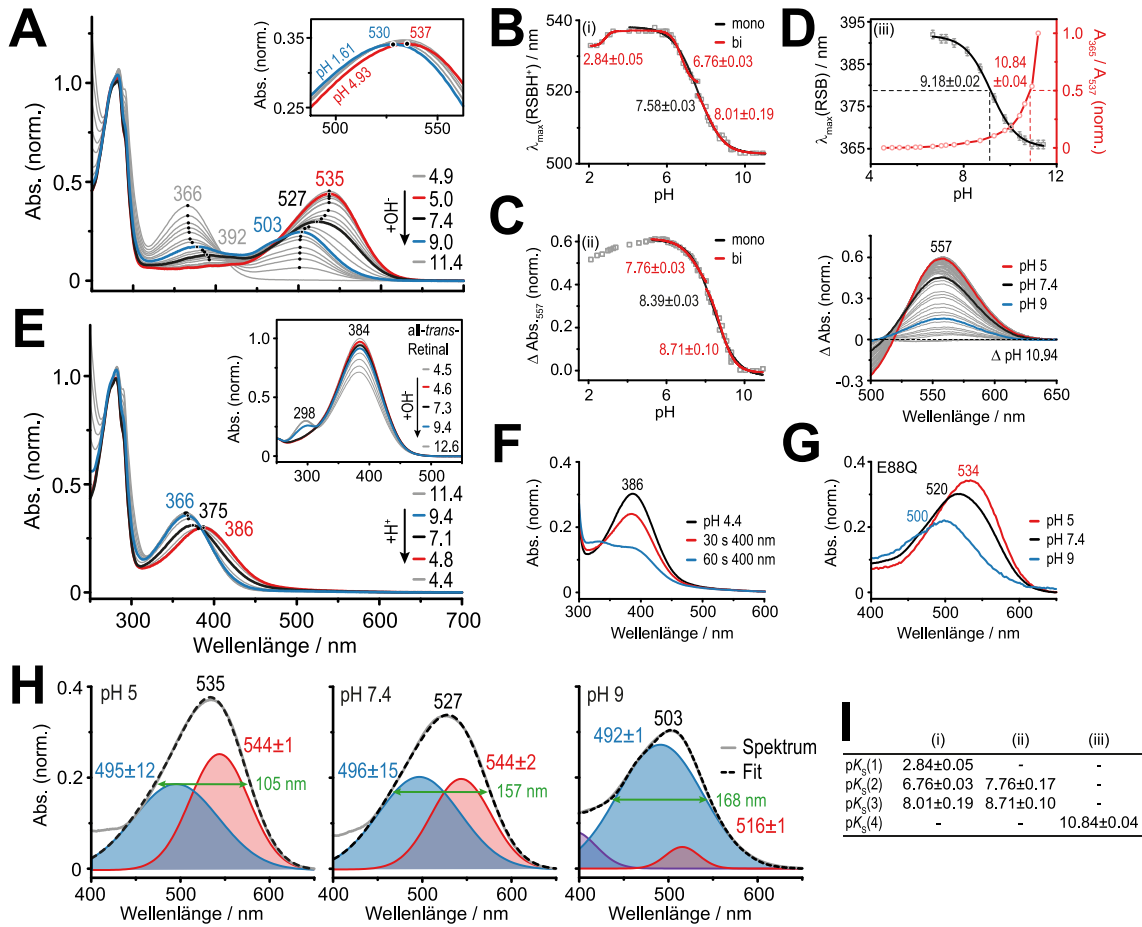


Abbildung 30: pH-Abhängigkeit des Dunkelzustands von ReaChR. **A)** UV-vis-Spektren von rekombinantem ReaChR in Titrationspuffer (jeweils 10 mM Citrat, BTP & CAPS, 100 mM NaCl & 0.03 % (w/v) DDM) zwischen pH 4.93 und 11.43 sowie zwischen pH 4.93 und 1.61 (Einschub). Absorptionsmaxima sind indiziert (*schwarze Kreise*) und für konkrete pH-Werte genannt. **B)** Titrationskurve (Methode 1: pH *vs.* Absorptionsmaxima der RSBH⁺-Form) aus zwei separaten Messungen. Datenpunkte zwischen pH 4.08 und 10.94 wurden mit einer (*schwarze*) bzw. zwei (*rot*) Boltzmann-Funktionen gefittet. Extrahierte pK_s -Werte sind aufgeführt. **C)** Differenzspektren (pH X minus pH 10.94) nach Normierung auf Chromophorabsorption (*rechts*) und Titrationskurve (Methode 2: pH *vs.* Absorptionsänderungen bei 557 nm) aus zwei separaten Messungen (*links*). **D)** Titrationskurve (pH *vs.* Absorptionsmaxima, *schwarze*) und Bildung der deprotonierten RSB-Spezies (*rot*). **E)** pH-abhängige UV-vis-Spektren von ReaChR (pH 11.43 → 4.44) nach alkalischer Deprotonierung der RSB in A. pH-Abhängigkeit von all-*trans*-Retinal in Titrationspuffer (pH 4.54 → 12.61) (Einschub, cf. Abbildung 26B). **F)** Belichtung von D₃₉₂ (λ_{\max} = 386 nm) bei pH 4.44 mit UV-Licht (400 nm LED, 6.4×10^{20} Photonen m⁻² s⁻¹). **G)** UV-vis-Spektren der E88Q-Mutante von ReaChR bei pH 5 (10 mM Citrat, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM), pH 7.4 (DPBS incl. 0.03 % (w/v) DDM) und pH 9 (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM). **H)** Gauß-Fits der UV-vis-Spektren (IDA) bei pH 5, 7.4 und 9. Die Werte der Maxima der Komponenten (*rot* bzw. *blau*) und der Halbwertsbreite (*grün*) sind angegeben. **I)** Zusammenfassung der pK_s -Werte aus B - D.

Ähnlich zu den blau-absorbierenden ChRs C₇ChR2-H134R und C1C2 (cf. Abbildung 26) korreliert die Abnahme der Chromophorbande in ReaChR mit der Bildung einer deprotonierten RSB-Spezies bei ca. 392 nm (D₃₉₂), welche mit einem pK_s = 9.18±0.02 eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlänge erfährt (λ_{\max} = 366 nm, D₃₆₆). Im Falle von ReaChR findet die Deprotonierung der RSB mit einem pK_s -Wert von 10.84±0.04 statt und ist bei pH 11.43 quantitativ (Abbildung 30D). Damit liegt der pK_s der RSBH⁺ in ReaChR zwischen Werten für P₃ChR2 (~ 10.5) (Govorunova *et al.* 2013) und BR (11.2±0.01) (Marti, Rösselet *et al.* 1991). Nach

vollständiger Deprotonierung der RSB im Alkalischen, kann D_{366} durch Azidifizierung in D_{392} ($\lambda_{\max} = 386$ nm) umgewandelt werden (Abbildung 30E). Das Spektrum von D_{392} weist eine deutlich geringere Halbwertsbreite als die entsprechenden Spektren von *CrChR2*-H134R und C1C2 auf (cf. Abbildung 26D, E). Die bathochrome Farbverschiebung um 20 nm wird wahrscheinlich durch eine Protonierungsreaktion nahe der RSB verursacht, eventuell derselben, welche die Verschiebung von D_{503} nach D_{535} induziert (Abbildung 30A). UV-Belichtung (30 - 60 s, 400 nm LED) des D_{392} bei pH 4.44 induzierte keine Reprotonierung der RSB, sondern lediglich ein Ausbleichen der UV-Spezies (Abbildung 30F).

CrChR1 ist wie *VrChR1* und *ReaChR* stark pH-abhängig und weist eine Farbverschiebung von $\lambda_{\max} = 463$ nm bei pH 8 nach $\lambda_{\max} = 505$ nm bei pH 4.5 auf (Berthold *et al.* 2008). Durch Mutation der Glutaminsäure 87 in H1 (E87Q) konnte die pH-Abhängigkeit ausgeschaltet werden und E87Q zeigte das nahezu identische Aktionsspektrum bei pH 4.5 und 7.5 ($\lambda_{\max} = 515$ nm). Infolgedessen wurde E87 eine entscheidende Rolle bei der Protochromie zugewiesen (Tsunoda & Hegemann 2009). Die analoge Aminosäuresubstitution in *ReaChR* (E88Q) zeigte jedoch eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie der Wildtyp (Abbildung 30G).

Aufgrund der großen Halbwertsbreite der UV-vis-Spektren (105 - 168 nm) von isoliertem *ReaChR* lassen sich die Chromophorpeaks nur mit zwei (bis drei) Gauß-Kurven beschreiben (Abbildung 30H). Für die Spektren bei pH 5, 7.4 und 9.0 kann eine Spezies bei ca. 495 nm ausgemacht werden, wessen Anteil mit sinkender Protonenkonzentration zunimmt. Im Gegenzug ist beim Übergang von pH 5 nach pH 7.4 eine Abnahme der rot-verschobenen Komponente bei 544 nm zu verzeichnen. Die Fitroutine des pH 9 Spektrums liefert neben der blau-absorbierenden Spezies geringe Anteil einer spektralen Form mit $\lambda_{\max} = 512$ nm sowie einer deprotonierten Komponente bei 395 nm. Die blau-verschobene Spezies ($\lambda_{\max} \sim 495$ nm) könnte einer Proteinpopulation mit einem bzw. mehreren Resten nahe der RSB zugeordnet werden, welche mit einem pK_s zwischen pH 5 und 9 deprotoniert werden und so die positive Ladung an der $RSBH^+$ besser stabilisieren.

3.3.4 pH-Abhängigkeit des Photozyklus

Als erstes wurde der Photozyklus von rekombinantem *ReaChR* mittels transients UV-vis-Spektroskopie (Laseranregung mit 530 nm) bei pH 7.4 untersucht (Abbildung 31B, *links*). Bei der maximalen Zeitauflösung von 40 ns war bereits ein frühes zum Dunkelzustand ($\lambda_{\max} = 527$ nm, D_{527}) rot-verschobenes Intermediat (K) zu detektieren. Im Gegensatz zu *CrChR2*-H134R und C1C2 erfolgt die Benennung der Photointermediate in *ReaChR* analog der BR-Nomenklatur. K wandelt sich mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 1.01 ± 0.01 μ s in ein blau-verschobenes L-Photoprodukt ($\lambda_{\max}(\Delta Abs) \sim 460$ nm) um, welches für *CrChR2*-H134R und C1C2 (cf. Abbildung 25C, D) nicht beobachtet wurde. Anschließend geht der L-Zustand mit $t_{1/2} = 10.8 \pm 0.3$ μ s in ein breites M-Intermediat über, welches über mehrere Dekaden präsent ist und mit zwei Geschwindigkeitskonstanten in den zum Dunkelzustand spektral ähnlichen O-Zustand übergeht ($t_{1/2} = 6.54$ und 151 ms). L und M koexistieren bis in den frühen

Millisekundenbereich (Abbildung 31B, *rechts*). Abschließend erfolgte der Übergang von O nach D₅₂₇ mit $t_{1/2} > 10$ s. Ein später rot-verschobener Zustand (P₅₂₀ in CrChR2-H134R & C1C2, cf. Abbildung 25C, D) wurde unter physiologischen Bedingungen für ReaChR nicht beobachtet.

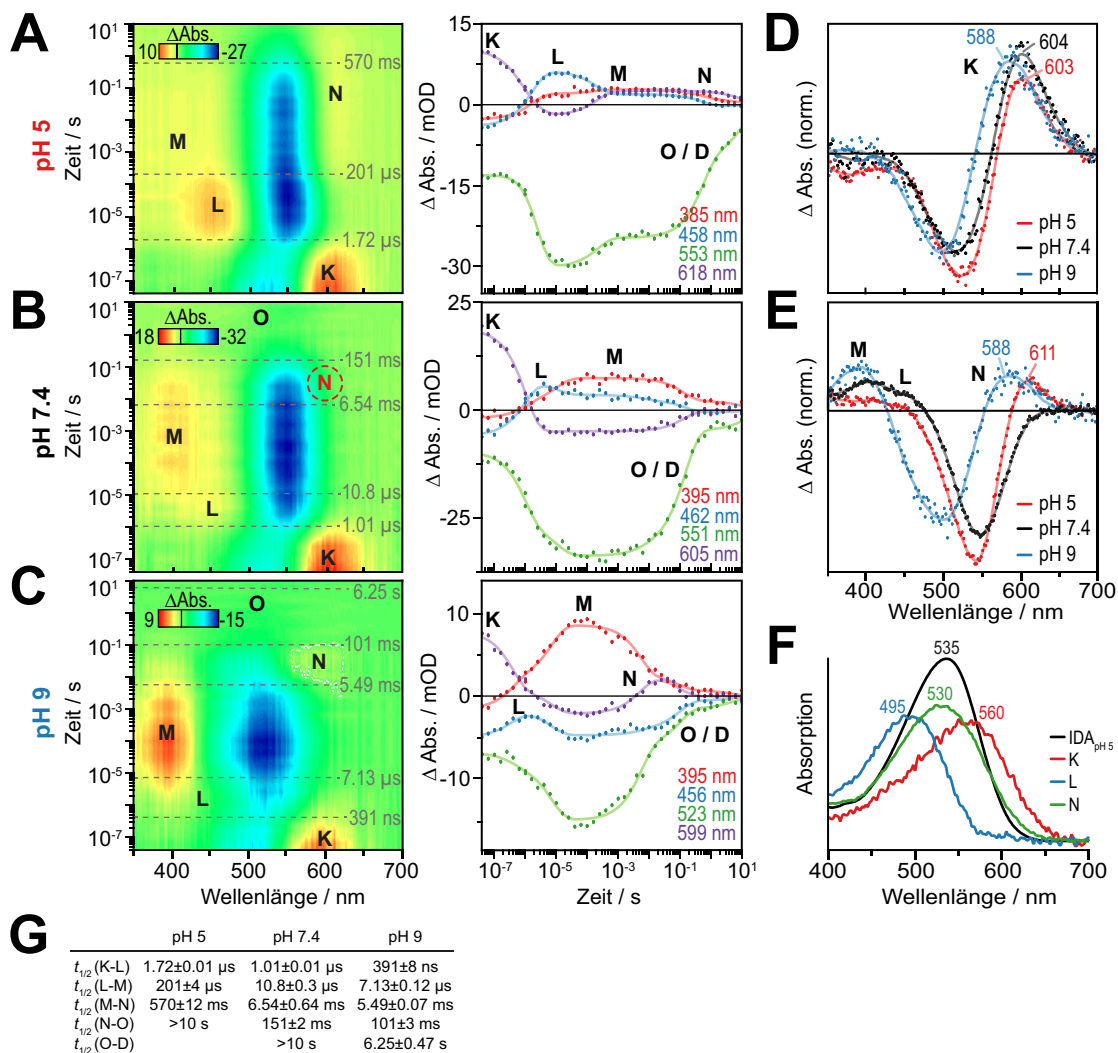


Abbildung 31: pH-Abhängigkeit des Photozyklus von ReaChR. Transiente UV-vis-Spektroskopie von rekombinantem ReaChR bei pH 5.0 (**A**, 10 mM Citrat, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM), pH 7.4 (**B**, DPBS incl. 0.03 % (w/v) DDM) und pH 9.0 (**C**, 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM). Proteinproben mit einer optischen Dichte von $A_{280} = 1.0$ wurden mit kurzen grünen Laserpulsen (530 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 MHz) angeregt und Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 40 ns und 10 s (15 Zyklen) detektiert. Benennung der Intermediate erfolgte nach der BR-Nomenklatur. Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) wurden mittels globaler Analyse mit 4 - 5 Komponenten nach SVD-Rekonstruktion bestimmt und sind in den Konturplots (*graue Striche*) skizziert. Einzelne Wellenlängen wurden extrahiert. Es sind die SVD-rekonstruierten Daten (*Punkte*) und globalen Fits (*Linien*) dargestellt. Vergleich der normierten K- (**D**, EADS1) und N-Differenzspektren (**E**, pH 5: EADS3 bzw. pH 7.4 & 9: EADS4). **F**) Absolutspektren der K-, L- und N-Intermediate wurden aus dem Dunkelspektrum bei pH 5 und den nichtnormierten EADS1 - 3 (nicht gezeigt) berechnet. Es wurde eine Photorezeptoraktivierung von 10 % des Dunkelzustands durch den applizierten Laserpuls angenommen. **G**) Zusammenfassung der $t_{1/2}$ in ReaChR.

Bei pH 5 ist der K \rightarrow L-Übergang etwas verlangsamt ($t_{1/2} = 1.72 \pm 0.01 \mu\text{s}$) und das L-Intermediat deutlicher sichtbar (Abbildung 31A, *links*). Mit einer Zeitkonstante von $t_{1/2} = 201 \pm 4 \mu\text{s}$ geht L in ein vermeintlich reprotoniertes N-Intermediat über, welches gegenüber

dem Dunkelzustand bei pH 5 ($\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$, D_{535}) zu längerwelligem Licht verschoben ist. Aufgrund der geringen Population des deprotonierten M-Zustands ist dessen spektrale Evolution nur schwer nachzuverfolgen. Dennoch ist eine ähnliche Bildungskinetik wie für L, aber eine längere Lebenszeit der deprotonierten Spezies auszumachen (Abbildung 31A, *rechts*). Wie bei pH 7.4 ist eine Koexistenz mehrerer Zustände, hier L und M bzw. M und N, über einige Dekaden zu beobachten. Mit $t_{1/2} = 570 \pm 12 \text{ ms}$ erfolgt der Zerfall der L/M-Mischung. Spätere Übergänge ($N \rightarrow O$ & $O \rightarrow D_{535}$) wurden in dem Messfenster bis 10 s nicht aufgelöst, was für eine globale Verlangsamung des gesamten Photozyklus unter sauren Bedingungen spricht.

Im Gegenzug sind im Alkalischen alle beobachteten Photoreaktionen beschleunigt (Abbildung 31C, *links*). Der $K \rightarrow L$ - bzw. $L \rightarrow M$ -Übergang erfolgt mit $391 \pm 8 \text{ ns}$ bzw. $7.13 \pm 0.12 \mu\text{s}$. Augenscheinlich wird die Deprotonierung der RSB bei pH 9 begünstigt, da das M-Intermediat im Vergleich zu pH 5 und 7.4 stärker ausgeprägt ist. Die Reprotonierung der RSB findet mit $t_{1/2} = 5.49 \pm 0.07 \text{ ms}$ statt und korreliert mit der Bildung eines zum Dunkelzustand (D_{503}) rot-verschobenen N-Zustands. N klingt mit $t_{1/2} = 101 \pm 3 \text{ ms}$ zu O ab und D_{503} wird mit $t_{1/2} = 6.25 \pm 0.47 \text{ s}$ restauriert.

Beim Vergleich der extrahierten normierten EADS lassen sich für das K- und N-Intermediat verschiedene Beobachtungen machen. Zum einen ist im Vergleich zum Ausbleichen des Dunkelzustands die Bildung des frühen K-Intermediats unter sauren Bedingungen reduziert, d.h. dass die Quantenausbeute für die Bildung des isomerisierten K-Zustands bei Azidifizierung verringert werden könnte (Abbildung 31D, *rot*). Dieser Befund ließe sich mit der Protonierung eines Restes nahe der RSB mit steigender H^+ -Konzentration erklären, da die Veränderung der elektrostatischen Umgebung des all-*trans*-Retinals einen Einfluss auf die Isomerisierung haben könnte. Scholz *et al.* beobachteten eine retardierte Isomerisierung bei pH 4 für CrChR2 sowie deren E123T-Mutante und haben geschlossen, dass eine negative Ladung innerhalb der Retinal-Bindetasche die Isomerisierung beschleunigt (Scholz *et al.* 2012). Aufgrund der relativen Langlebigkeit des angeregten Zustands könnte der ursprüngliche Grundzustand mit all-*trans*-Retinal stärker repopuliert werden und so die reduzierte Bildung von K bei niedrigem pH erklären.

Zum anderen sind die Absorptionsmaxima des K- und N-Photoprodukts unter alkalischem Milieu gegenüber neutralem und saurem pH hypsochrom verschoben. Dieser Befund impliziert eine Deprotonierungsreaktion eines Restes nahe der RSB mit einem pK_s -Wert zwischen 7.4 und 9, welche den elektronischen $RSBH^+$ -Grundzustand entsprechend stabilisieren würde.

Um die einzelnen Intermediate des Photozyklus besser charakterisieren zu können, wurden absolute Spektren aus dem Dunkelspektrum bei pH 5 (D_{535} , Abbildung 30H) und den nichtnormierten EADS (nicht gezeigt) berechnet. Es wurde eine Laseranregung von D_{535} von 10 % angenommen. Der frühe K-Zustand zeigt ein breites Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 560 nm (Abbildung 31F). Das neu identifizierte L weist eine maximale Absorption bei 495 nm auf, was eine protonierte $RSBH^+$ -Spezies suggeriert. Im Vergleich zu D_{535} ist der N-Zustand mit $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$ nur kaum verschoben, zeigt aber eine breitere Flanke bei größeren Wellenlängen. Die spektrale Überlagerung des Dunkelzustands mit dem N-Intermediat könnte

das Ausbleiben einer positiven Absorption in den Differenzspektren bei pH 7.4 im Millisekundenbereich (Abbildung 31B) erklären. Es scheint daher plausibel, dass das N-Photointermediat auch bei pH 7.4 populiert wird, doch vom stärker absorbierenden Dunkelzustand überlagert wird. Die Bildung und der Zerfall von N könnten also den Zeitkonstanten $t_{1/2} = 6.54 \pm 0.64$ ms und 151 ± 2 ms zugeordnet werden (Abbildung 31B, *roter gestrichelter Kreis*). Die Sichtbarkeit des N-Zustands bei pH 5 ist mit der geringeren Halbwertsbreite des D_{535} und bei pH 9 mit der hypsochromen Verschiebung von D_{503} im Vergleich zu D_{527} zu begründen (*cf.* Abbildung 30H, *links & rechts*). Abbildung 31G fasst alle Zeitkonstanten der identifizierten Übergänge zusammen.

3.3.5 Lichtadaptation und Grundzustandsheterogenität

Im Gegensatz zur Laseranregung, bei der nur ein hochenergetisches Photon vom Photorezeptor absorbiert wird und es zum Durchlaufen eines einzelnen Photozyklus kommt (engl. *single turnover conditions*), offeriert die Applikation längerer Lichtstimuli die Möglichkeit für sekundäre Photochemie bzw. Adaptationsphänomene. Letztere laufen auf einer Zeitskala von vielen Sekunden bis Stunden ab und beinhalten meistens die Veränderung des zugrunde liegenden Isomerenverhältnisses des Retinal-Cofaktors. Im Kontext dieses Abschnitts wurde die Lichtadaptation in ReaChR bei verschiedenen pH-Werten, unterschiedlichen Belichtungspulsen sowie Anregungswellenlängen untersucht.

Zur Etablierung konkreter Anfangsbedingungen wurde das Apoprotein von ReaChR in HEK293T exprimiert, während der Solubilisierung rekonstituiert und unter schwacher roter Hintergrundbelichtung ($\lambda > 600$ nm) aufgereinigt. Dieser Zustand wurde als initialer Dunkelzustand (IDA) definiert und zeigte ein λ_{\max} bei 527 nm (Abbildung 32A). Isoliertes ReaChR wurde für 1 s mit einer grünen LED (530 nm) belichtet und simultan die Absorptionsänderungen bei 550 nm gemessen (Abbildung 32B). Während der Belichtungsphase ist ein Ausbleichen zu detektieren, welche mit einer Zeitkonstante von $\tau_{DA} = 29.7 \pm 0.1$ s (Dunkeladaptationskinetik) revertiert und ein stationäres Plateau erreicht. Innerhalb des Beobachtungsfensters von 13 min wird die initiale Amplitude jedoch nicht wieder vollständig restauriert und es verbleibt ein Zustand mit leicht reduzierter Chromophorabsorption (apparenter Dunkelzustand, DA_{app}). Nach der kinetischen Messung wurde ein UV-vis-Spektrum aufgezeichnet und die Integrität des Proteins überprüft. Aufgrund der geringen Änderungen war jedoch global kaum ein Unterschied auszumachen. In zwei weiteren Belichtungsexperimenten konnten das Ausmaß des „Ausbleichens“ sowie τ_{DA} reproduziert werden.

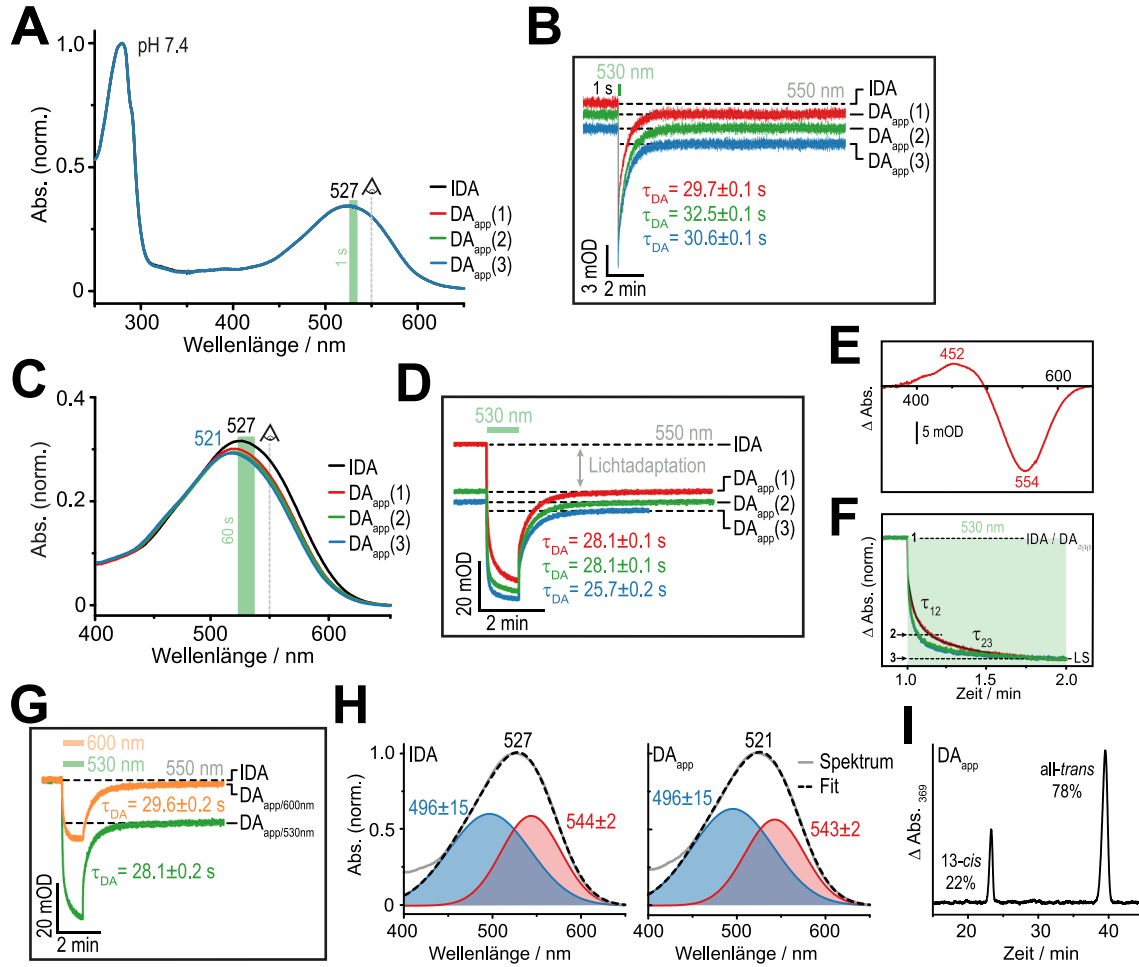


Abbildung 32: Lichtadaptation von ReaChR bei pH 7.4. UV-vis-Spektren des initialen Dunkelzustands (IDA) und der verschiedenen apparenten Dunkelzustände (DA_{app}) von ReaChR in DPBS incl. 0.03 % (w/v) DDM nach sukzessiver Belichtung (530 nm LED, 1×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) für 1 s (A) bzw. 60 s (C) und anschließender kinetischer Messung (B) bzw. (D). Absorptionsänderung bei 550 nm nach Belichtung für 1 s (B) bzw. 60 s (D). τ -Werte der Adaptationskinetik (τ_{DA}) aus monoexponentiellem Fit. E) Differenzspektrum ($DA_{app}(1)$ minus IDA) aus C. F) Normierte Illuminationsphase aus D. Die Bildung des photostationären Lichtzustands (LS) erfolgt biphasisch mit einer exponentiellen Komponente von $1 \rightarrow 2$ (τ_{12}) und einer eher linearen von $2 \rightarrow 3$ (τ_{23}). G) Absorptionsänderungen bei 550 nm nach Illumination mit orangenem Licht (590 nm LED mit 600 nm BPF, 60 s, 2.1×10^{19} Photonen $m^{-2} s^{-1}$). Die erste Kinetik nach Grünbelichtung aus D ist zum Vergleich gezeigt. τ_{DA} aus monoexponentiellem Fit. H) IDA- und $DA_{app}(3)$ -Spektrum aus C wurden mit jeweils zwei Gauß-Funktionen gefittet. Absorptionsmaxima der jeweiligen Glockenkurven sind dargestellt. I) Retinal-Extraktion und HPLC-Analyse nach zehnminütiger Belichtungs- (LED ~530 nm) und Dunkelphase. Mittels Peakintegration wurde das Verhältnis von all-*trans*- zu 13-*cis*-Retinal bestimmt. Retinal-Extraktion wurde von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt. Das für die Retinal-Extraktion verwendete Protein wurde aus *P. pastoris* exprimiert (Christina Schnick, AG Hegemann, HU Berlin).

Als nächstes wurde eine Serie mit drei Messungen bei 60 s Illumination (530 nm LED) durchgeführt. Im Gegensatz zur Kurzzeitbelichtung war die Lichtadaptation deutlich stärker ausgeprägt und das λ_{max} der Chromophorbande zu kürzeren Wellenlängen verschoben ($\lambda_{max} = 521$ nm nach der dritten Belichtung). Das berechnete Differenzspektrum (erste Belichtung minus IDA) zeigt ein Maximum bei 452 nm (Abbildung 32E). Während der zweiten und dritten Belichtung nahm der Anteil der zusätzlichen Adaptation sukzessive ab.

Bemerkenswerterweise wurde τ_{DA} nur marginal von der längeren Illuminationszeit beeinflusst (cf. Abbildung 32B, D). Die Bildung des photostationären Lichtzustands (LS) ließ sich nur zufriedenstellend mit zwei kinetischen Komponenten approximieren, wobei der erste Übergang ($1 \rightarrow 2$) einer exponentiellen (τ_{12}) und der zweite ($2 \rightarrow 3$) eher einer linearen Kinetik (τ_{23}) folgt (Abbildung 32F). Im Gegensatz zur Belichtung mit Grünlicht verursacht die Anregung von ReaChR in der längerwelligen Flanke (600 nm LED, 60 s) nur geringe permanente spektrale Änderungen (Abbildung 32G). τ_{DA} lag jedoch in der gleichen Größenordnung wie nach Grünbelichtung.

Die Chromophorabsorption des IDA und des DA_{app} (3 aus Abbildung 32C) wurden mittels Gauß-Funktionen angenähert und es konnten jeweils zwei Spezies mit λ_{max} bei ca. 500 und 540 nm identifiziert werden (Abbildung 32H). Die beiden Komponenten könnten zum Beispiel unterschiedlichen Retinal-Isomeren zugeordnet werden, deren Verhältnis zueinander sich in Abhängigkeit des Belichtungspulses verändert.

Um eine zuverlässigere Aussage über die Isomerenkomposition im DA_{app} treffen zu können, wurde eine Retinal-Extraktion nach zehnminütiger Belichtungs- (~530 nm LED) und zehnminütiger Dunkelphase vorgenommen und die Isomere *via* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) getrennt. Integration der Peakflächen im Chromatogramm lieferte ein Verhältnis von all-*trans*:13-*cis* von 78:22 (Abbildung 32I). Die Zusammensetzung des DA_{app} ist in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten anderer ChRs (Kirsch 2007; Nack *et al.* 2009; Stehfest *et al.* 2010; Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014). Es soll an dieser Stelle vermerkt werden, dass aufgrund der Hydrolyse der RSB keine Aussage über die C₁₅=N-Doppelbindung im Holoprotein getroffen werden kann. Dennoch scheint es plausibel, dass im DA_{app} von ReaChR 13-*trans*, 15-*anti* als Haupt- und 13-*cis*, 15-*syn* als Nebenisomer auftreten.

Im Anschluss wurde die Lichtadaptation bei pH 5 und 9 nach Langzeitbelichtung (5 - 60 s, 530 nm LED) untersucht. Der IDA bei pH 5 zeigt ein Absorptionsmaximum bei 535 nm (Abbildung 33A). In Analogie zu pH 7.4 ist während der Illumination (60 s) ein starkes Ausbleichen zu beobachten, welches innerhalb der Belichtungsphase einen photostationären Zustand (LS) erreicht (Abbildung 33B, *rechts*). Nach Beendigung des Lichtpulses wird mit einer Zeitkonstante von $\tau_{DA} = 34 - 36$ s ein stationäres Niveau bei einer geringeren Chromophorabsorption etabliert. Die reduzierte Amplitude bei 550 nm korreliert mit der Bildung einer blauen Schulter bei ca. 460 nm (Abbildung 33A, *Einschub*) und einer ausgeprägten hypsochromen Verschiebung des λ_{max} nach 522 nm (nach dritter Belichtung). Wie unter physiologischen pH-Bedingungen ist das Ausmaß der Adaptation in der ersten Belichtungsphase am stärksten ausgeprägt.

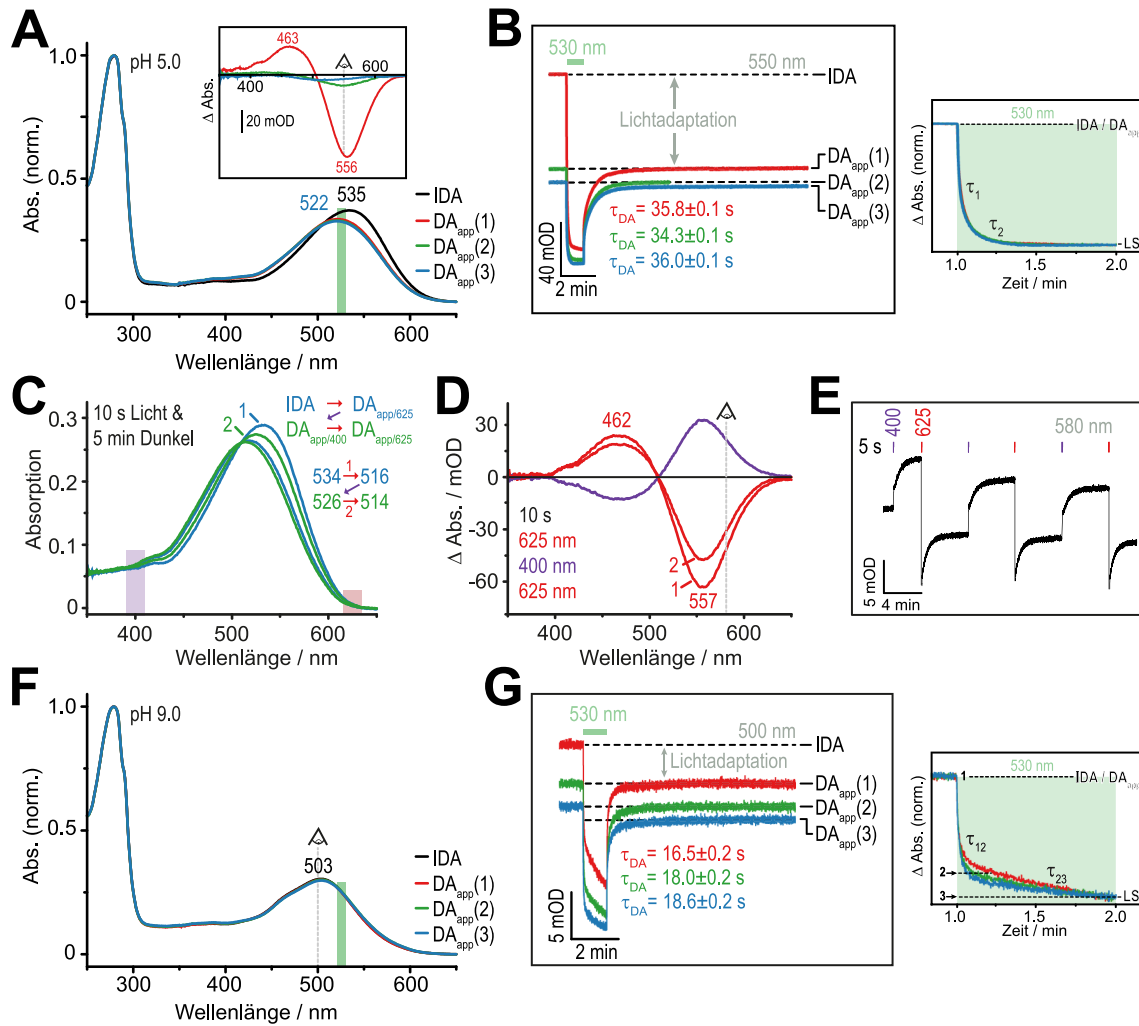


Abbildung 33: Lichtadaptation von ReaChR bei pH 5.0 und pH 9.0. UV-vis-Spektren des initialen (IDA) und der apparenten Dunkelzustände (DA_{app}) nach Belichtung (530 nm, LED, 60 s, 1×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) bei pH 5 (**A**, 10 mM Citrat, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM) und pH 9 (**F**, 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM). Lichtinduzierte (530 nm, 60 s) Absorptionsänderungen bei 550 nm und pH 5 (**B**) bzw. 500 nm und pH 9 (**G**). τ -Werte der Adaptationskinetik (τ_{DA}) aus monoexponentiellem Fit. Bildung des photostationären Lichtzustands (LS) folgt biphasischer Kinetik (*rechts*). **C**) UV-vis-Spektren nach sequentieller Belichtung mit 625 nm (10 s, LED, 1.9×10^{21} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) und 400 nm (10 s, LED, 6.4×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) bei pH 5. Nach jeder Illumination folgte eine fünfminütige Dunkelphase bevor das nächste Spektrum aufgenommen wurde. Das Belichtungsprotokoll, die einzelnen Zustände sowie deren Absorptionsmaxima sind skizziert. **D**) Berechnete Differenzspektren aus **C**. **E**) Absorptionsänderung bei 580 nm während der Zweifarben-Belichtungsreihe (400 & 625 nm, LEDs, jeweils 5 s) bei pH 5.

Um eine hypothetische Grundzustandsheterogenität für ReaChR zu untersuchen, kann neben ultraschneller UV-vis-Spektroskopie ein duales Belichtungsprotokoll Aufschluss geben. Für Letzteres wurde der isolierte Photorezeptor nacheinander in seiner roten bzw. blauen Flanke mit Rotlicht (625 nm) bzw. UV-Licht (400 nm) angeregt und die induzierten Absorptionsänderungen in kinetischen und stationären Messungen untersucht. Es wäre zu erwarten, dass in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge eine der beiden Retinal-Spezies bevorzugt aktiviert wird, vorausgesetzt, dass sie sich in ihrer spektralen Lage (deutlich) unterscheiden. Nach initialer Rotbelichtung (625 nm, 10 s) des IDA und fünfminütiger

Dunkelphase war der gebildete $DA_{app/625nm}$ um 18 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben ($\lambda_{max} = 516$ nm) (Abbildung 33C). Das berechnete Differenzspektrum ($DA_{app/625nm}$ minus IDA, *rot 1*, Abbildung 33D) zeigte mit einem Maximum bei 462 nm große Ähnlichkeiten zum entsprechenden Differenzspektrum nach Grünbelichtung (*cf.* Abbildung 32E). Es folgte ein UV-Lichtpuls (400 nm, 10 s) und eine erneute Dunkelphase, in welcher sich ein apparenter Dunkelzustand ($DA_{app/400nm}$) mit $\lambda_{max} = 526$ nm formierte. Das zugrunde liegende Differenzspektrum ($DA_{app/400nm}$ minus $DA_{app/625nm}$, *lila*, Abbildung 33D) zeigte ein nahezu spiegelbildliches Abbild des rotlichtinduzierten Differenzspektrums. Lediglich die Amplituden der roten und blauen Flanke waren kleiner. Abschließend wurde $DA_{app/400nm}$ erneut mit $\lambda_{Exz} = 625$ nm bestrahlt. Es wurde ein Zustand generiert, welcher bis auf ein leicht blau-verschobenes Absorptionsmaximum von 2 nm dem ersten $DA_{app/625nm}$ entspricht.

Auch in den Differenzspektren ist ein nahezu identisches Muster auszumachen (Abbildung 33D). Während die Bildung des blau-verschobenen $DA_{app/625nm}$ quasi reproduzierbar ist, kann der IDA nicht mittels UV-Belichtung wiederhergestellt werden. Diese Tendenz äußert sich auch in einer kinetischen Messung der Absorptionsänderungen bei 580 nm. Die Amplitude des gebildeten $DA_{app/400nm}$ nimmt innerhalb der dualen Belichtungsserie sukzessive ab, wobei der $DA_{app/625nm}$ fast quantitativ repopuliert werden kann (Abbildung 33E). Anscheinend weisen IDA und $DA_{app/625nm}$ eine ähnliche Absorption im blauen Spektralbereich auf, so dass bei Belichtung mit 400 nm beide Zustände simultan angeregt werden und es nicht zu einer vollständigen Konversion in die rot-verschobene Spezies kommt. Als alternative Erklärung könnte eine irreversible Änderung des Isomerengemisches im Rahmen der ersten Anregung dienen, welche nicht durch erneute Belichtung wieder in den Ursprungszustand überführt werden kann.

Innerhalb der pH-Reihe sind die geringsten Änderungen unter alkalischen Bedingungen (pH 9) auszumachen. Zwar ist keine substanzielle Blauverschiebung in den UV-vis-Spektren zu beobachten (Abbildung 33F), jedoch ist τ_{DA} gegenüber pH 5 und 7.4 deutlich beschleunigt (Abbildung 33G).

3.3.6 Photozyklus in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge

Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss der Anregungswellenlänge auf den Photozyklus von ReaChR untersucht. Als Referenz diente die Messung nach Laseranregung bei 530 nm (*cf.* Abbildung 31B & Abbildung 34B). Rekombinantes ReaChR wurde einmal in der blauen Flanke ($\lambda_{Exz} = 450$ nm) und einmal in der roten Flanke ($\lambda_{Exz} = 600$ nm) angeregt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Nach Applikation des blauen Laserpulses ($\lambda_{Exz} = 450$ nm) geht das frühe K-Intermediat mit $t_{1/2} = 1.14 \pm 0.02$ μs in den deprotonierten M-Zustand über (Abbildung 34A, *links*). Die Bildung von M setzt sich mit einer zweiten Zeitkonstante von $t_{1/2} = 9.60 \pm 0.33$ μs fort und ein L-Intermediat ist nicht zu beobachten. Im weiteren Verlauf zerfällt M mit zwei Halbwertszeiten von 4.54 ± 0.53 ms und 52.2 ± 1.3 ms zum O-Zustand. Im Vergleich zur Referenzmessung bei $\lambda_{Exz} = 530$ nm sind die Abklingkinetiken der deprotonierten RSB-Spezies, vor allem der zweiten

Konstante, beschleunigt. Da bei pH 7.4 der reprotonierte N-Zustand ($\lambda_{\max} = 530$ nm) vom Dunkelzustand D₅₂₇ überlagert wird (cf. Abbildung 31F), werden die beiden letztgenannten Zeitkonstanten auch hier der Bildung und dem Zerfall von N zugeschrieben. Mit $t_{1/2} = 6.24 \pm 0.43$ s wird der Dunkelzustand repopuliert.

Bei Laseraktivierung mit orangenem Licht ($\lambda_{\text{Exz}} = 600$ nm) sind alle spektralen Intermediate im Vergleich zur Messung nach grüner Laseranregung konserviert (Abbildung 34C). Nur die Halbwertszeiten der einzelnen Zustände sind global verlangsamt (Abbildung 34E). Ein retardierter Photozyklus nach Laseranregung mit 600 nm lässt sich gut anhand der Transienten des M-Intermediates visualisieren (Abbildung 34D). Im Gegensatz dazu sind die De- und Reprotonierungsreaktionen der RSB(H⁺) nach Anregung mit 450 nm beide beschleunigt.

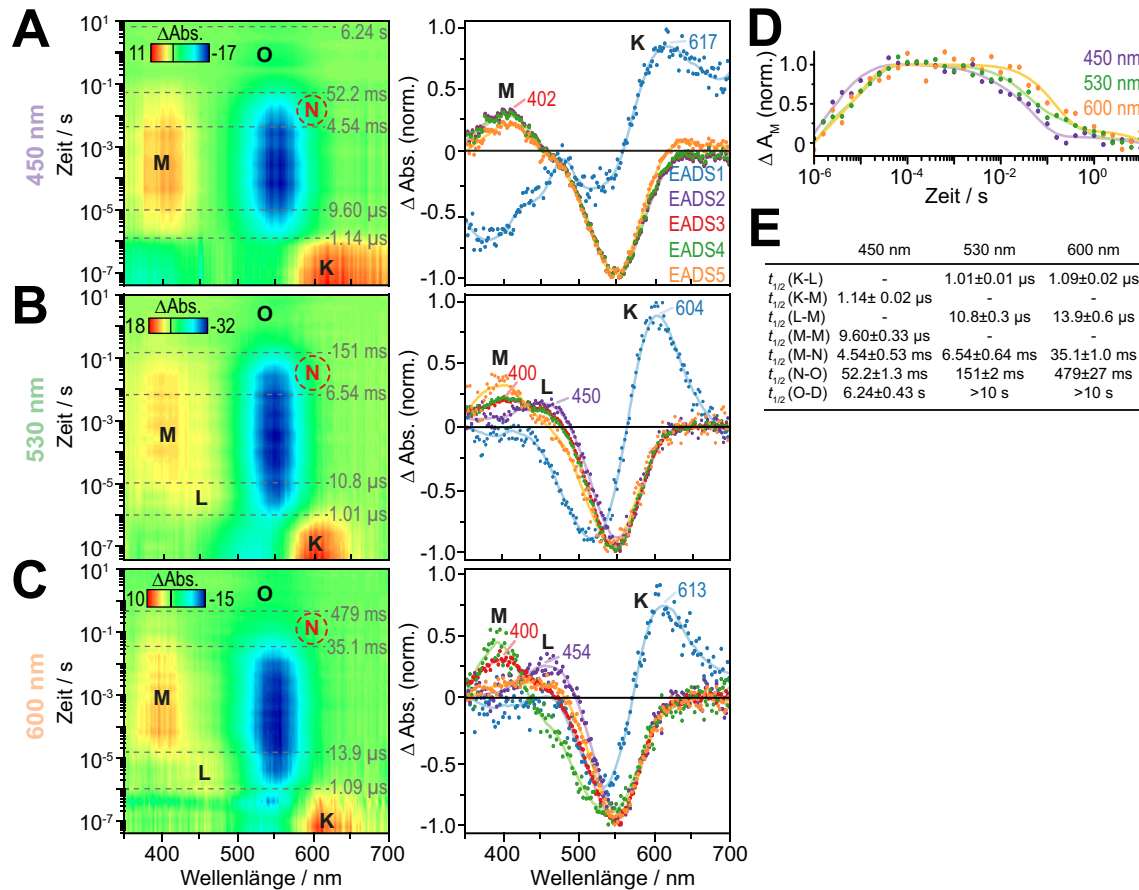


Abbildung 34: Wellenlängenabhängigkeit des Photozyklus von ReaChR. Transiente UV-vis-Spektroskopie von rekombinantem ReaChR ($A_{280} = 1.0$) in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM nach Laseranregung mit 450 nm (A, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 mHz), 530 nm (B, 10 ns, 5 mJ, 7.69 mHz) und 600 nm (C, 10 ns, 5 mJ, 7.69 mHz). Gemittelte Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 40 ns und 10 s nach dem Laserpuls aus 11 - 22 Zyklen. Normierte EADS (rechts) und die assoziierten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue Striche, links) wurden nach SVD-Rekonstruktion aus einer globalen Analyse mit fünf Komponenten extrahiert. Überlagerter N-Zustand ist skizziert (rote gestrichelte Kreise). Maximale Absorptionsänderungen in den EADS sind markiert (Zahlen). D) Absorptionsänderungen bei 395 nm (M-Intermediat) aus A - C. E) Zusammenfassung der spektralen Übergänge aus A - C.

3.3.7 Einfluss der Salzkonzentration

Innerhalb dieses Kapitels wurde der Einfluss der Ionenstärke wässriger Pufferlösungen auf das Absorptionsmaximum des Dunkelzustands und des Photozyklus untersucht. Unter physiologischen Bedingungen (Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung, DPBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , Ionenstärke $I_s = 164$ mM) zeigt ReaChR ein Absorptionsmaximum bei 527 nm. Bei Equilibrierung in salinen Pufferlösungen geringerer I_s wurde eine bathochrome Farbverschiebung von bis zu 12 nm beobachtet (Abbildung 35). Durch Korrelation von I_s mit λ_{max} lässt sich eine Dissoziationskonstante von $K_d = 37.9 \pm 1.0$ mM bestimmen (Abbildung 35A, Einschub).

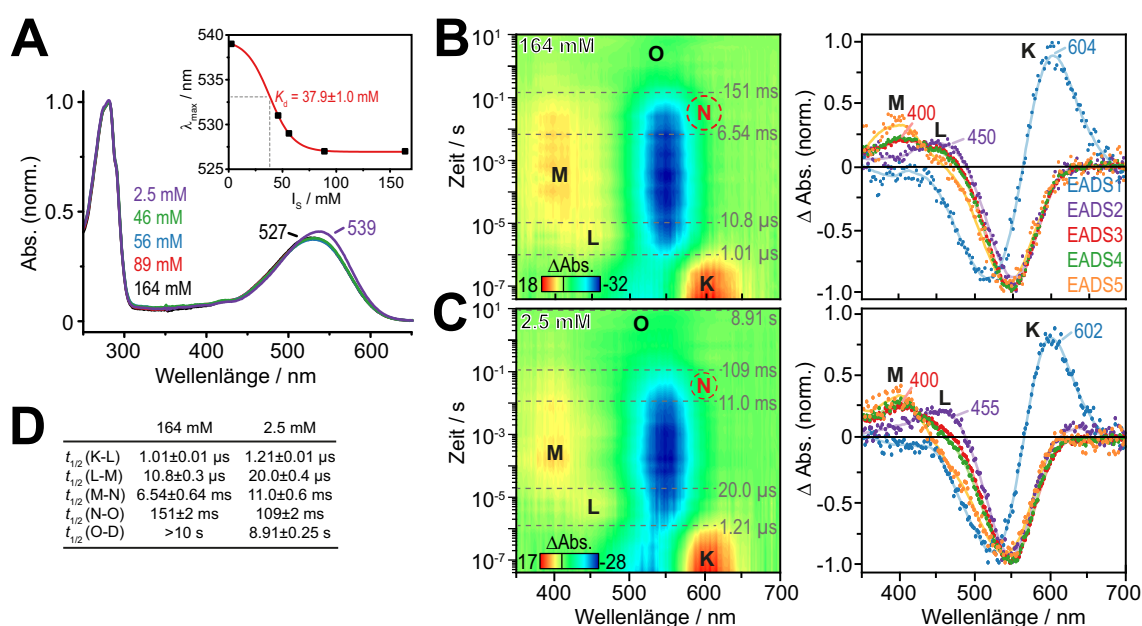


Abbildung 35: Salzabhängigkeit von ReaChR. **A)** UV-vis-Spektren von ReaChR in Puffern (pH 7.4 & 0.03 % (w/v) DDM) verschiedener Ionenstärke (I_s): $I_s = 2.5$ mM (10 mM TRIS, 2.5 mM NaCl); $I_s = 46$ mM (Niedrigsalz-PBS); $I_s = 56$ mM (45.6 mM NaCl, 0.89 mM KCl, 2.7 mM Na_2HPO_4 & 0.49 mM KH_2PO_4); $I_s = 89$ mM (DPBS mit 60 mM NaCl) und $I_s = 168$ mM (DPBS). Korrelation der Absorptionsmaxima mit I_s der Puffer (Einschub). Dissoziationskonstante (K_d) extrahiert aus sigmoidalem Fit (rot). Transiente UV-vis-Spektroskopie (530 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 MHz) in DPBS (**B**) bzw. Puffer mit $I_s = 2.5$ mM (**C**). Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) von Proben mit $A_{280} = 1.0$ wurden zwischen 40 ns und 10 s detektiert (13 - 15 Zyklen). EADS (rechts) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue gestrichelte Linien, links) aus globaler Analyse mit fünf Komponenten. Maximale Absorptionsänderungen in den EADS sind markiert. **D)** Zusammenfassung der $t_{1/2}$ der spektralen Übergänge aus B und C.

Die ausgeprägte Verschiebung suggeriert eine vermeintliche „Bindestelle“ von geladenen Ionen nahe der RSBH⁺. Im Falle eines gebundenen Chlorid-Ions könnte die zusätzliche negative Ladung nahe der RSBH⁺ in ReaChR bei höheren Salzkonzentrationen die positive Ladung am Stickstoff besser stabilisieren und so die benötigte Anregungsenergie vergrößern, d.h. eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums induzieren.

Als nächstes wurden transiente UV-vis-Messung nach Laseranregung (530 nm) bei einer Ionenstärke von 2.5 mM durchgeführt und mit der Referenzmessung bei 164 mM (cf. Abbildung 31B & Abbildung 35B) verglichen. In der niedrigsalinen Probe werden alle Photointermediate

(K, L, M, (N) & O) populiert und es ist auch keine signifikante Farbverschiebung der einzelnen Zustände auszumachen (Abbildung 35C, *rechts*), d.h. dass die vermutete Bindung eines monovalenten Anions nur einen spektralen Einfluss auf den Dunkelzustand ausübt. Ob das entsprechende Ion nur initial gebunden ist und nach Photoaktivierung abgegeben wird, lässt sich hier nur spekulieren.

Interessanterweise sind zwischen den physiologischen und Niedrigsalz-Bedingungen kinetische Unterschiede zu beobachten. Während die ersten drei Übergänge ($K \rightarrow L$, $L \rightarrow M$ & $M \rightarrow N$) in der niedrighsalinen Pufferlösung leicht verlangsamt sind, ist der Zerfall des N- und des O-Intermediats beschleunigt (Abbildung 35C, D). Ein rapiderer Zerfall des P_{520} (N) und P_{480} (O) ist ebenfalls in der E129A-Mutante (Zentrales Tor) von C1C2 bei reduzierter NaCl-Konzentration (10 mM) auszumachen (*cf.* Abbildung A 4).

3.3.8 Mutationen des DC-Paars

Innerhalb der Retinal-Bindetasche von CrChR2 befinden sich drei polare Aminosäuren (C128, D156 & T159) (*cf.* Abbildung 4D). Substitutionen des konservierten DC-Paars (*cf.* Abbildung 5) verlängern die Lebenszeit des leitenden Zustands um das 2 - 150.000fache (*cf.* Tabelle 2). Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um den offenen Zustand sowie sekundäre Photochemie in ReaChR zu charakterisieren.

ReaChR-C168T

Als erstes wurde die CrChR2-C128T-analoge Mutation für ReaChR (C168T) generiert und spektroskopisch untersucht. Bemerkenswerterweise war das Dunkelspektrum gegenüber dem Wildtyp um 23 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben (Abbildung 36).

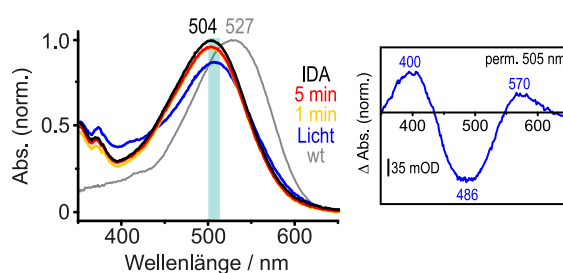


Abbildung 36: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-C168T. Normierte UV-vis-Spektren von ReaChR-C168T in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM im initialen Dunkelzustand (IDA, *schwarz*), unter permanenter Belichtung (505 nm LED, *blau*) sowie 1 min (*orange*) und 5 min (*rot*) nach Beendigung des Lichtpulses. Als Folge der Retinal-Supplementation während der Expression ist eine UV-Feinstruktur (*cf.* Abbildung 27E) zu beobachten. Wildtyp-Spektrum ist zum Vergleich gezeigt (*grau*). Differenzspektrum (Licht minus Dunkel) wurde berechnet (Einschub).

Nach Illumination (30 & 60 s, 505 nm, LED) war kein spektraler Unterschied des belichteten Zustands auszumachen (nicht gezeigt). Lediglich unter permanenter Belichtung konnten der deprotonierte M- und der reprotonierte N-Zustand angereichert werden (Abbildung

36, Einschub). Eine Minute nach Messung des Spektrums und Ausschalten des Lichtpulses war nahezu das gesamte Protein in den Dunkelzustand zurückgekehrt (Abbildung 36, *orange*). Die Befunde suggerieren einen ungewöhnlich schnellen Photozyklus (\sim ms - s Bereich) für die „SFO“-Mutante in ReaChR. In der Chimäre C1V1, welche eine hohe Homologie zu ReaChR aufweist, war die analoge Mutante (C167T) auch nur 10fach verlangsamt ($\tau_{\text{off}} = 1.3 \pm 0.8$ s; WT: 130 ± 17 ms) (Prigge *et al.* 2012; Prigge 2012). Der geringe Einfluss auf die Lebenszeit des offenen Zustands könnte teilweise auf die native T159C-Substitution zurückzuführen sein (*cf.* Tabelle 2).

ReaChR-C168S

Da die C168T-Substitution in ReaChR keinen verlangsamen Photozyklus bedingte, wurde die entsprechende Serin-Mutante (C168S) kreiert und ebenfalls spektroskopisch analysiert. Das Spektrum von ReaChR-C168S ist gegenüber dem WT nahezu nicht verschoben (2 nm) (Abbildung 37A). Nach kurzer Belichtung (1 s, 530 nm) ist die Bildung des deprotonierten M-Intermediats zu beobachten, welches innerhalb von 90 min komplett zerfallen ist. Wie nach Blitzlichtanregung des WT bei pH 7.4 (*cf.* Abbildung 31B) ist im Differenzspektrum der Mutante keine positive Absorption im längerwelligen Spektralbereich auszumachen (Abbildung 37A, linker Einschub). In analoger Weise wird hier die spektrale Überlagerung des Dunkelzustands ($\lambda_{\text{max}} = 525$ nm, D_{525}) mit dem N-Zustand ($\lambda_{\text{max}} = 530$ nm, *cf.* Abbildung 31F) als Erklärung angeführt. Immerhin konnte N aufgrund der Blauverschiebung des Dunkelzustands in C168T beobachtet werden (*cf.* Abbildung 36, Einschub). Diese Hypothese lässt sich zusätzlich durch einen Fit des illuminierten Zustands (LS) bestätigen, welcher neben dem deprotonierten M, geringe Menge des frühen L sowie den reprotonierten N-Zustand ($\lambda_{\text{max}} = 531 \pm 2$ nm) zeigt (Abbildung 37A, rechter Einschub).

Durch Verlängerung des eingestrahnten Lichtstimulus (60 s, 530 nm) wird das M-Intermediat stärker angereichert, evtl. sogar auf Kosten des N-Intermediats (Abbildung 37B). Im Gegensatz zur Kurzzeitbelichtung kehrt das angeregte Protein nicht vollständig in den IDA zurück, sondern ein Teil geht in eine bzw. zwei Spezies über, welche ein Absorptionsmaximum bei 420 und 460 nm ($P_{420/460}$) zeigen. Die Illuminationsphase (60 s, 530 nm) von C168S zeigt wie der WT (*cf.* Abbildung 32F) eine biphasische Kinetik (Abbildung 37C). Es scheint daher plausibel, die schnelle Komponente (τ_{12}) der Photoaktivierung des Dunkelzustands und die langsame (τ_{23}) der Bildung von $P_{420/460}$ zuzuordnen. Nach Ausschalten der Belichtung nähert sich die Absorption bei 550 nm biexponentiell ($\tau_1 = 153.4 \pm 0.1$ s, 89 %; $\tau_2 = 41.55 \pm 0.06$ min, 11 %) einem stationären Niveau an (DA_{app}), erreicht jedoch innerhalb des Messfensters von 2 h nicht das initiale Absorptionslevel (IDA). Die zugrunde liegenden Zeitkonstanten wurden dem $N \rightarrow O$ - und $O \rightarrow D$ - bzw. $O \rightarrow DA_{\text{app}}$ -Übergang zugeschrieben. Basierend auf dieser Zuordnung wäre die Lebenszeit des offenen Zustands in C168S ca. 1.000fach verlängert (WT: $t_{1/2}(N \rightarrow O) = 151 \pm 2$ ms, *cf.* Abbildung 31B). Auch nach Tagen im Gefrierschrank ist immer noch $P_{420/460}$ als Teil des UV-vis-Spektrums auszumachen (Abbildung 37D). Infolgedessen ist auf eine sehr langsame, wenn nicht sogar verhinderte Konversion dieser Spezies in den

Dunkelzustand zu schließen. Interessanterweise lässt sich $P_{420/460}$ aber quantitativ mit UV-Belichtung (400 nm, 60 s) in den Dunkelzustand überführen (Abbildung 37D, Einschub).

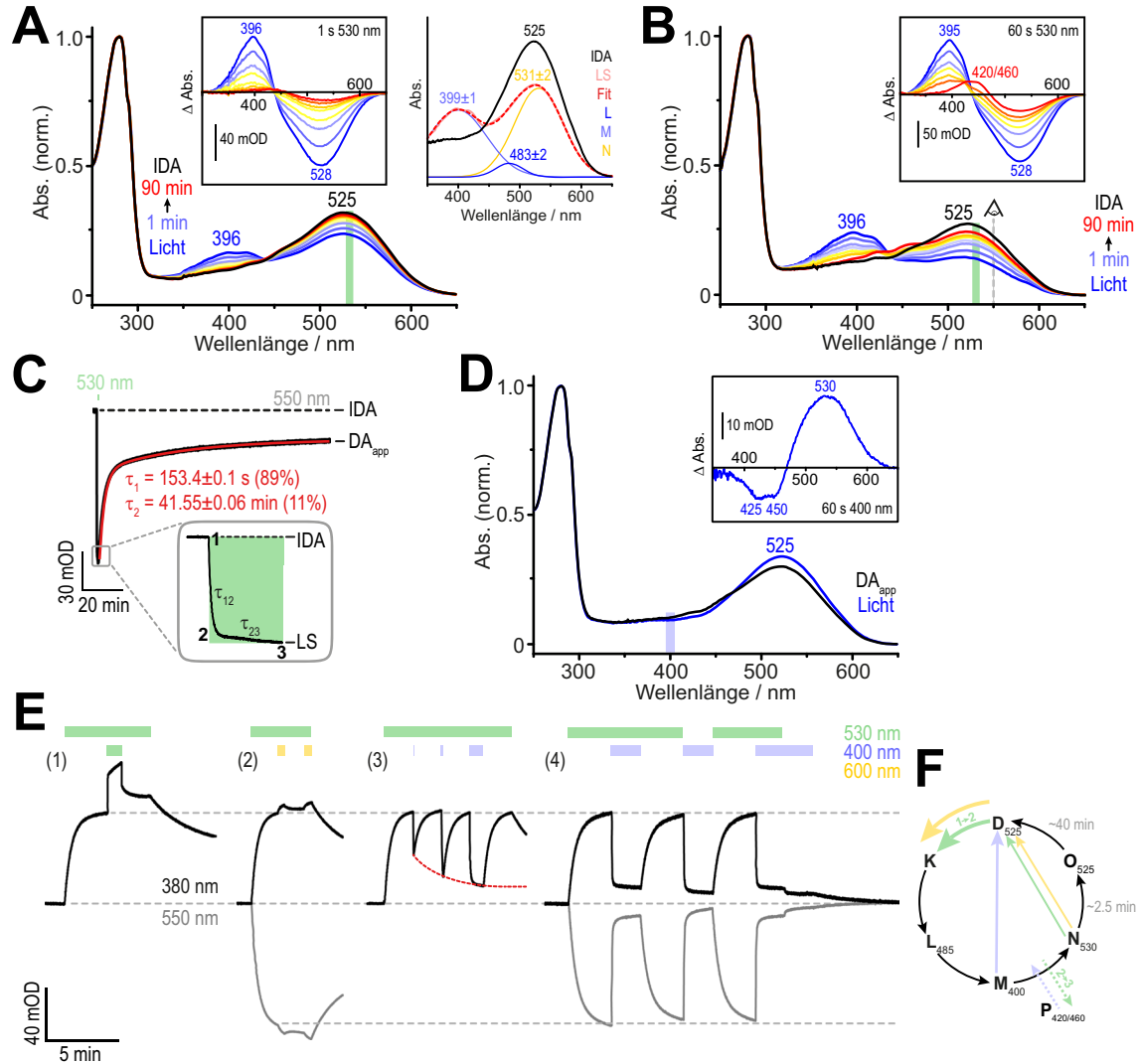


Abbildung 37: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-C168S. Normierte UV-vis-Spektren des initialen Dunkelzustands (IDA) von ReaChR-C168S und nach Belichtung (530 nm, LED, 1×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) für 1 s (A) bzw. 60 s (B). Differenzspektren (Licht minus Dunkel) wurden berechnet (Einschübe). Das Absorptionsspektrum des Lichtzustands (LS, *pastellrot*) wurde mit drei Gauß-Glockenkurven gefittet. Deren Maxima sowie die kumulative Fitfunktion (*rot-gestrichelt*) sind illustriert (A, rechter Einschub). C) Absorptionsänderungen bei 550 nm nach Belichtung (530 nm, LED, 60 s). Biphasische Bildung von LS mit einer exponentiellen (τ_{12}) und einer eher linearen (τ_{23}) Komponente (Einschub). „Rückkehr“ in den apparenten Dunkelzustand (DA_{app}) nach Beendigung des Lichtpulses wurde biexponentiell gefittet (*rot*). D) Konversion von $P_{420/460}$ nach D_{525} mit UV-Licht (400 nm, LED, 60 s, 6.4×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$). E) Ein photostationärer Zustand wurde durch schwaches Grünlicht (530 nm, LED, 5.6×10^{19} Phot. $m^{-2} s^{-1}$) gebildet und zusätzlich bei 530 nm (1: 3.6×10^{20} Phot. $m^{-2} s^{-1}$), 600 nm (2: 590 nm, LED mit 600 nm-BPF, 2.1×10^{19} Phot. $m^{-2} s^{-1}$) oder 400 nm (3 & 4: 1×10^{20} Phot. $m^{-2} s^{-1}$) belichtet. Absorptionsänderungen bei 380 nm (M) und 550 nm (N, O & D_{525}) wurden detektiert. F) Photozyklus-Modell von ReaChR-C168S unter Dauerlicht. Intermediate K und O wurden in Analogie zum Wildtyp postuliert. Lichtinduzierte (*farbig*) und thermische (*schwarz*) Übergänge sind gezeigt. Die Photoaktivierung ($1 \rightarrow 2$) und die Bildung von $P_{420/460}$ ($2 \rightarrow 3$) sind skizziert. Die Einordnung des Seitenwegs zu $P_{420/460}$ ist nicht eindeutig, erfolgt aber erst nach Zerfall des M-Intermediats. Gerundete Zeitkonstanten (*grau*) aus C. Alle gezeigten Experimente wurden in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM durchgeführt.

Als nächstes wurden sekundäre Photoprozesse in ReaChR im Rahmen von Doppelbelichtungsexperimenten evaluiert. Aufgrund der spektralen Separation der einzelnen Intermediate in C₁ChR2 (D₄₇₀, P₃₉₀ & P₅₂₀), lässt sich der Photozyklus in den langsamen DC-Paar Mutanten entsprechend abkürzen, sowie der Kanalstrom mit Blau bzw. UV und Grün an- bzw. ausschalten (SFO) (Berndt *et al.* 2009; Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011). Da das reprotonierte N-Intermediat ($\lambda_{\text{max}} \sim 530$ nm) gegenüber dem Dunkelzustand ($\lambda_{\text{max}} = 525$ nm) nahezu nicht verschoben ist (Abbildung 37A, rechter Einschub), sind allerdings unterschiedliche Ergebnisse für ReaChR zu erwarten. Die spektrale Evolution von M wurde bei 380 nm und N, O sowie D₅₂₅ bei 550 nm detektiert. Unter schwacher grüner Hintergrundbelichtung (530 nm) wurde ein photostationärer Zustand generiert, welcher sich hauptsächlich aus den langlebigen Intermediaten M und N sowie nicht angeregtem D₅₂₅ zusammensetzt. Kontinuierliche Belichtung induziert nicht nur die permanente Anregung des Dunkelzustands (D₅₂₅ → K), sondern führt auch zu einer intrazirkulären Konversion von N zu D₅₂₅, d.h. es wird ein „abgekürzter“ Zwei-Photonen-Zyklus durchlaufen (Abbildung 37F, *grün*). Die Beteiligung des O-Zustands kann aufgrund der langsamen Bildungskinetik nahezu ausgeschlossen werden. Der photostationäre Zustand wurde zusätzlich mit Lichtpulsen verschiedener Wellenlängen bestrahlt. Bei zusätzlicher Grün- (530 nm) und Orangebelichtung (600 nm) konnte mehr deprotoniertes M angereichert werden, was mit einem weiteren „Ausbleichen“ bei 550 nm korrelierte (Abbildung 37E, (1) & (2)). Obwohl der Dunkel- und N-Zustand stark überlappen, wird durch die zweite Belichtung anscheinend primär D₅₂₅ angeregt, wahrscheinlich aufgrund eines höheren Extinktionskoeffizienten des Dunkelzustands.

Anders verhält es sich bei intermediärer UV-Belichtung. Kurze eingestrahlte UV-Pulse (400 nm) verschieben den Zwei-Photonen-Zyklus zugunsten des Dunkelzustands, jedoch bedarf es einer Pulslänge von 1 - 2 min um ein analoges photostationäres Gleichgewicht zu etablieren (Abbildung 37E, (3) & (4)). Unter reiner UV-Belichtung verbleibt eine residuale Absorption bei 380 nm, welche erst nach Beendigung des Lichtpulses langsam auf das initiale Niveau zurückkehrt. Dies mag auf die verlangsamte thermische Relaxation der langlebigen Photoprodukte P_{420/460} zum D₅₂₅ zurückzuführen sein. Das Schema in Abbildung 37F fasst alle postulierten Photoreaktionen von C168S zusammen.

ReaChR-D196N

Rekombinantes D196N absorbiert bei 523 nm und damit 4 nm blau-verschoben gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 38A). Nach Belichtung (530 nm, 60 s) und anschließender Dunkelphase (10 min) ist das Spektrum unter Bildung einer blauen Flanke um 17 nm hypsochrom verschoben. Das berechnete Differenzspektrum mit einem Maximum bei 458 nm (Abbildung 38A, Einschub) ähnelt dem des WT unter analoger Illumination bei pH 5 und 7.4 (*cf.* Abbildung 32E & Abbildung 33A), welches durch Änderungen des Isomerengemisches erklärt wurde. Im Gegensatz zum WT sind die beobachteten Änderungen bei pH 7.4 für D196N aber deutlich stärker ausgeprägt. Durch Fitten des IDA- und des DA_{app}-Spektrums lässt sich eine Zunahme der Spezies mit $\lambda_{\text{max}} \sim 500$ nm ausmachen (Abbildung 38B). In Analogie zum WT

(cf. Abbildung 32) könnte hier eine Anreicherung des 13-*cis*, 15-*syn*-Isomers des Retinal-Cofaktors unter Langzeitbelichtung postuliert werden.

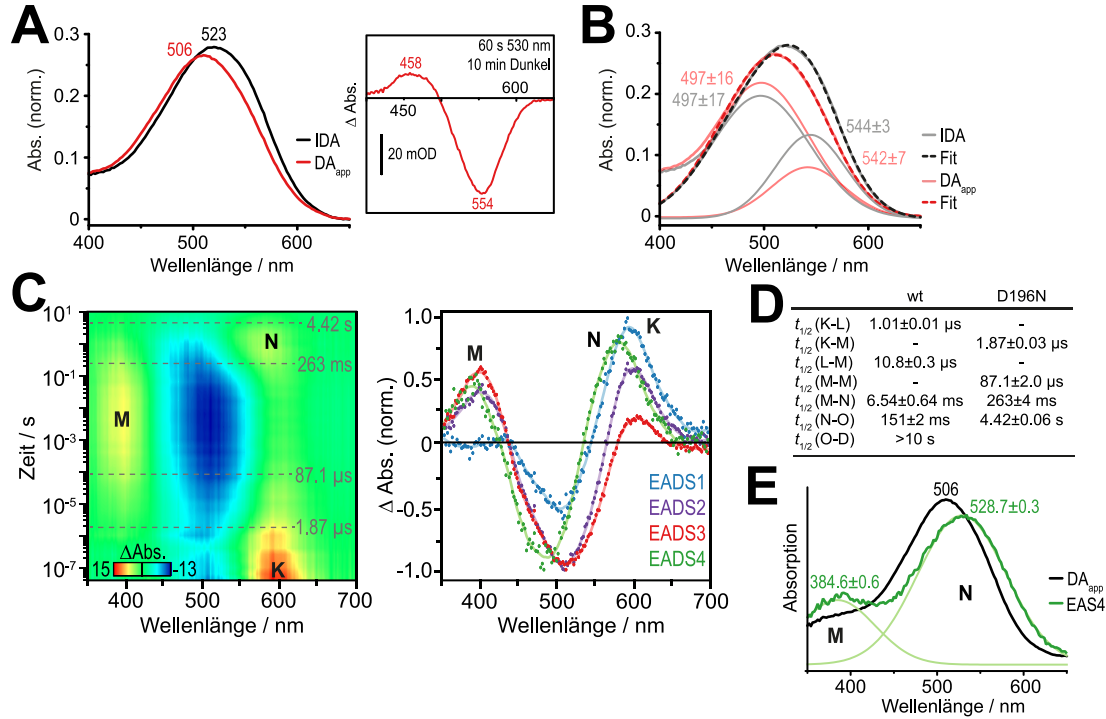


Abbildung 38: UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-D196N. **A)** UV-vis-Spektren des initialen (IDA) und des apparenten Dunkelzustands (DA_{app}: 60 s mit 530 nm, LED (1x10²⁰ Photonen m⁻² s⁻¹) & 10 min Dunkelheit). Differenzspektrum (IDA minus DA_{app}) wurde berechnet (Einschub). **B)** IDA und DA_{app} wurden mit jeweils zwei Gaußfunktionen gefittet. Maxima der einzelnen Glockenkurven sind aufgelistet. **C)** Transiente Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) nach Laseranregung (530 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 mHz) zwischen 40 ns und 10 s (22 Zyklen). Proben einer optischen Dichte von A₂₈₀ = 1.0 wurden verwendet. EADS (rechts) und deren Halbwertszeiten (t_{1/2}, graue gestrichelte Linien) entstammen einer globalen Analyse mit vier Komponenten nach vorheriger SVD-Rekonstruktion. **D)** Zusammenfassung der spektralen Übergänge und deren t_{1/2} im Vergleich zum WT (cf. Abbildung 31B). **E)** Absolutspektrum von N. Das nichtnormierte EADS4 (nicht gezeigt) wurde mit einem Anteil von DA_{app} (10 %) addiert. Absorptionsmaxima wurden mittels Gauß-Fit bestimmt. Alle Experimente wurden in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM durchgeführt.

In transienten UV-vis-Messungen ist neben dem frühen K- und dem M- auch der späte reprotonierte N-Zustand ausgeprägt (cf. Abbildung 38C). Ein analoges L-Intermediat wurde jedoch nicht beobachtet, so dass das frühe K direkt nach M übergeht (t_{1/2} = 1.87±0.03 μs). Im weiteren Verlauf nimmt die Amplitude des deprotonierten Zustands mit t_{1/2} = 87.1±2.0 μs weiter zu. Die Reprotonierung der RSB, d.h. M→N, erfolgt mit t_{1/2} = 263±4 ms und ist im Vergleich zum WT (t_{1/2} = 6.54 ms) 40fach verlangsamt (Abbildung 38D). Eine ähnliche Retardierung (29fach) lässt sich für die Abklingkinetik von N bilanzieren (D196N: t_{1/2} = 4.42±0.06 s; WT: 151±2 ms). Innerhalb des Messfensters von 10 s ist die Rückkehr in den Dunkelzustand nicht aufgelöst. Auf Basis des nichtnormierten EADS4, welches hauptsächlich den N-Zustand zeigt, und dem DA_{app}-Spektrum (10 % Anregung) wurde das Absolutspektrum (EAS4) berechnet und die einzelnen Komponenten mittels Gauß-Fit extrahiert. Neben dem

ausgeprägten N-Zustand ($\lambda_{\max} = 528.7 \pm 0.3$ nm) koexistiert M als Subpopulation (Abbildung 38E).

3.3.9 Mutation des Zentralen Tors

Lichtadaptation und pH-Abhängigkeit von ReaChR-E130Q

Das Absorptionsspektrum von ReaChR-E130Q ist im Vergleich zum WT um 14 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben und weist neben einer erhöhten Amplitude auch eine reduzierte Halbwertsbreite auf (Abbildung 39A). Des Weiteren zeigt E130Q nach Belichtung (530 nm, 60 s) und anschließender Dunkelphase (10 min) ein starkes „Ausbleichen“ des UV-vis-Spektrums bei ~ 530 nm sowie eine Blauverschiebung nach $\lambda_{\max} = 508$ nm (Abbildung 39A). In Analogie zum WT (*cf.* Abbildung 32H) und D196N (*cf.* Abbildung 38B) könnte dieser Befund eventuell mit einer unterschiedlichen Isomerenkomposition der beiden Dunkelzustände (IDA *vs.* DA_{app}) korrelieren.

Als nächstes wurde die pH-Abhängigkeit des Dunkelzustands untersucht. Wie für den WT (*cf.* Abbildung 30) wurde aufgereinigtes Protein in einem breiten pH-Bereich (pH 4.45 - 11.96) mit kleinen Volumina an 1 M NaOH titriert und spektroskopisch vermessen (Abbildung 39B). Die Evaluation erfolgte über Auslesen der Absorptionsmaxima (Methode 1, Abbildung 39C, i) sowie über die Amplitude der maximalen Differenz innerhalb der pH-Reihe (Methode 2, ii). Unabhängig von der jeweiligen Auswertungsform konnte eine moderate Blauverschiebung zwischen pH 4.7 ($\lambda_{\max} = 521$ nm) und pH 7.2 ($\lambda_{\max} = 512$ nm) konstatiert werden. Bei höheren pH-Werten war neben der graduellen Abnahme der Chromophoramplitude, keine signifikante Blauverschiebung mehr zu registrieren. Die Deprotonierung der RSB ist durch die Aminosäuresubstitution zwar um ca. eine pH-Einheit in den alkalischen Bereich verschoben (Abbildung 39C, iii), jedoch ist die pH-abhängige Konversion ihrer beiden UV-Isoformen (D₃₈₇ & D₃₆₇) quasi nicht beeinträchtigt (Abbildung 39B, rechter Einschub). Lediglich zeigt D₃₆₇ in E130Q höhere Absorptionswerte im nahen UV ($\lambda < 320$ nm) gegenüber dem WT (*cf.* Abbildung 30A).

Beide Auswertroutinen lieferten nur einen pH-abhängigen Übergang bei 5.70 ± 0.17 (Methode 1) bzw. 7.16 ± 0.06 (Methode 2) (Abbildung 39C). Trotz der relativ großen Abweichungen könnte diese (De-)Protonierungsreaktion dem zweiten pK_s -Wert des WT (6.76 ± 0.03 bzw. 7.76 ± 0.07) zugeordnet werden. Da der dritte pK_s -Wert des WT in E130Q nicht vorhanden ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine (De-)Protonierungsreaktion von E130 handelt.

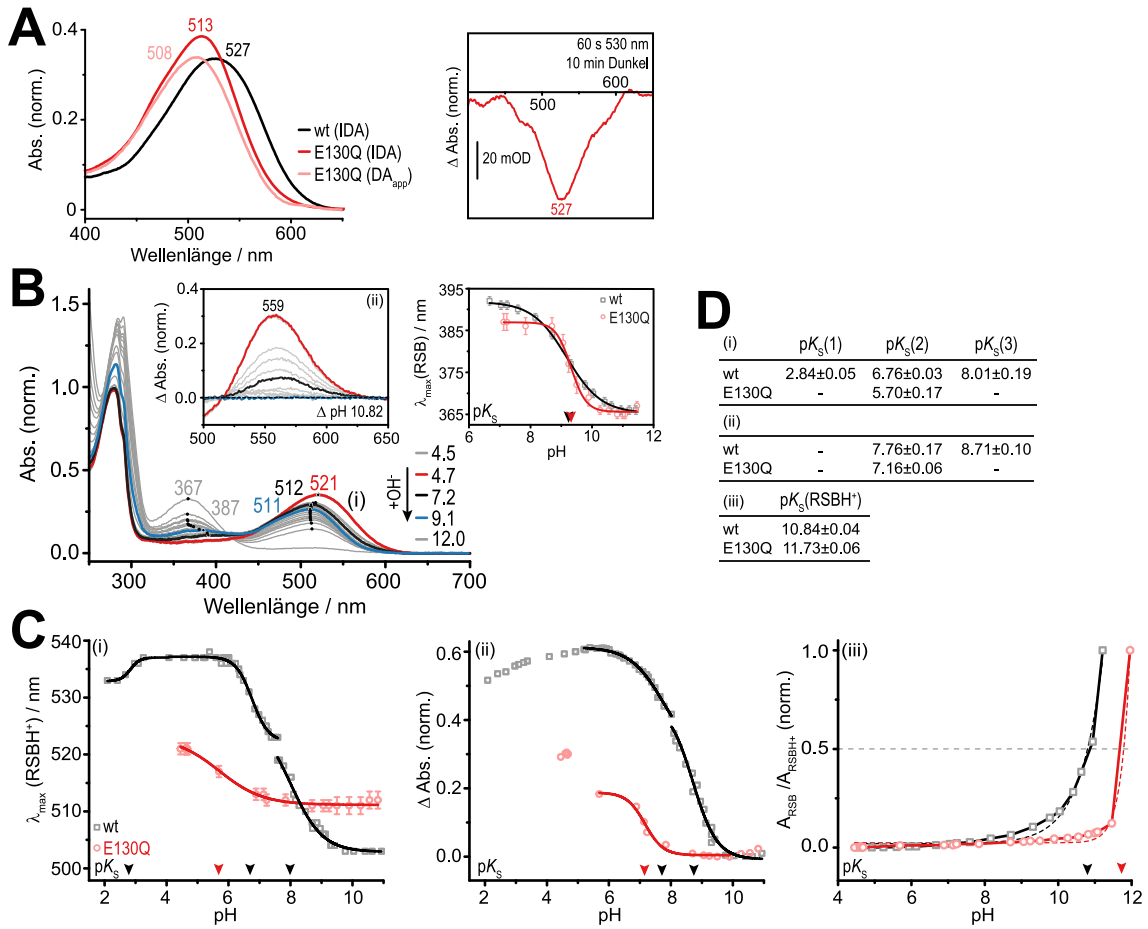


Abbildung 39: Stationäre UV-vis-Spektroskopie und pH-Abhängigkeit von ReaChR-E130Q. **A)** UV-vis-Spektrum des initialen (IDA, rot) und des apparenten Dunkelzustands (DA_{app}, bellrot, 60 s, 530 nm, LED (1×10^{20} Photonen $m^{-2} s^{-1}$) & 10 min Dunkelheit) von E130Q in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM im Vergleich zum IDA des WT (schwarz). Differenzspektrum (DA_{app} minus IDA) wurde berechnet (Einschub). **B)** Normierte UV-vis-Spektren von rekombinantem E130Q in Titrationspuffer (jeweils 10 mM Citrat, BTP & CAPS, 100 mM NaCl & 0.03 % (w/v) DDM) zwischen pH 4.45 und 11.96. Absorptionsmaxima sind skizziert (schwarze Kreise) und für konkrete pH-Werte gelistet. Differenzspektren (pH X minus pH 10.82) nach Normierung auf Chromophorabsorption wurden berechnet (linker Einschub). Titrationskurve (pH vs. Absorptionsmaxima) der deprotonierten RSB-Form (rechter Einschub). Datenpunkte (Kreise) wurden mit sigmoidaler Boltzmann-Funktion (Linien) gefittet. Extrahierte pK_s -Werte sind skizziert (Pfeile). **C)** pH-Titrationskurven nach Methode 1 (pH vs. Absorptionsmaxima, i) bzw. Methode 2 (pH vs. maximale Absorptionsänderungen bei 559 nm, ii) und RSBH⁺-Deprotonierung (normiertes Verhältnis A_{367}/A_{521} , iii). **D)** Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten pK_s -Werte. Wildtyp-Daten aus Abbildung 30.

Transiente UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-E130Q

Es folgte die Charakterisierung von Photozyklusintermediaten auf einer Zeitskala zwischen 40 ns und 10 s nach Laseranregung (530 nm). Wie für D196N (*cf.* Abbildung 38C) ist kein L-Intermediat zu beobachten, stattdessen findet eine direkte Konversion des frühen K-Intermediats zum deprotonierten M mit $t_{1/2} = 971 \pm 21$ ns statt (Abbildung 40A). Anschließend gewinnt M weiter an Intensität ($t_{1/2} = 8.69 \pm 0.26$ μ s) und geht mit einer Halbwertszeit von 10.4 ± 0.1 ms in den reprotonierten N-Zustand über. Der Photozyklus wird

durch den $N \rightarrow O$ - ($t_{1/2} = 92.3 \pm 2.2$ ms) und den $O \rightarrow D$ -Übergang (7.77 ± 0.30 s) beendet. Im Vergleich zum WT ist die Deprotonierung der RSB sowie der Zerfall des N- und O-Intermediats beschleunigt (Abbildung 40B).

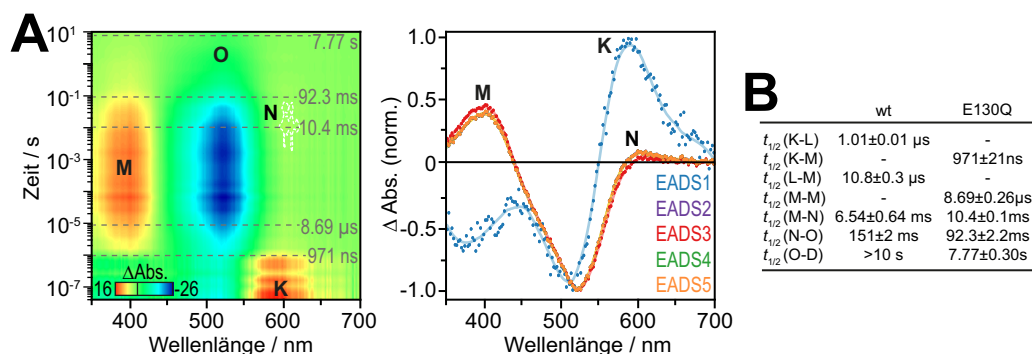


Abbildung 40: Transiente UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-E130Q. **A**) Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 40 ns und 10 s (11 Zyklen) nach Laseranregung (530 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 mHz) von E130Q in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. EADS (*rechts*) und deren Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, *graue gestrichelte Linien, links*) wurden nach SVD-Rekonstruktion mittels globaler Analyse mit fünf Komponenten extrahiert. **B**) Vergleich der ermittelten $t_{1/2}$ mit denen des WT (*cf.* Abbildung 31B).

3.3.10 Mutationen des Gegenionenkomplexes

Stationäre UV-vis-Spektroskopie und pH-Abhängigkeit von E163T und D293N

Die beiden Gegenionen in ReaChR wurden gegen nichtionisierbare Aminosäuren (E163T & D293N) ausgetauscht und die rekombinanten Mutanten im Anschluss spektroskopisch untersucht. Nach Substitution war eine geringe Rotverschiebung von 1 - 3 nm zu beobachten (Abbildung 41A). Aufgrund des etwas größeren Effekts von E163T lässt sich vermuten, dass E163 im Wildtyp näher zur RSB orientiert ist. Die Spektren (IDA) der Gegenionenmutanten weisen eine geringere Halbwertsbreite als der WT auf und D293N zeigt zudem eine höhere Absorption (Abbildung 41A, B). Nach Belichtung (60 s, 530 nm) und anschließender Dunkelphase (10 min) sind nahezu keine spektralen Änderungen zu verzeichnen, d.h. keine Lichtadaptation findet statt (nicht gezeigt). Durch Fitten der IDA-Spektren lässt sich für E163T eine ähnliche Zusammensetzung aus blauer ($\lambda_{\max} \sim 500$ nm) und grüner Spezies ($\lambda_{\max} \sim 540$ nm) wie im WT identifizieren (*cf.* Abbildung 41B). Dieser Befund suggeriert entweder ähnliche Protonierungszustände oder Isomerenverhältnisse wie im WT. Im Gegensatz dazu zeigt D293N eine unterschiedliche Verteilung mit anderen spektralen Komponenten.

Wie bereits mehrfach durchgeführt, wurden pH-abhängige spektrale Übergänge auch für die beiden Gegenionenmutanten untersucht. Zwischen pH 4.53 und 7.69 sind die Absorptionsmaxima von E163T kaum verändert ($\lambda_{\max} = 529.0 \pm 1.0$ nm) und es kommt erst zu einer signifikanten hypsochromen Verschiebung bei weiterer Reduktion der Protonenkonzentration ($\lambda_{\max} = 514$ nm, pH 9.2) (Abbildung 41C). Ähnlich verhält es sich für

D293N, dessen λ_{\max} erst unter stark alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 10$) zu kürzeren Wellenlängen übergeht (Abbildung 41D).

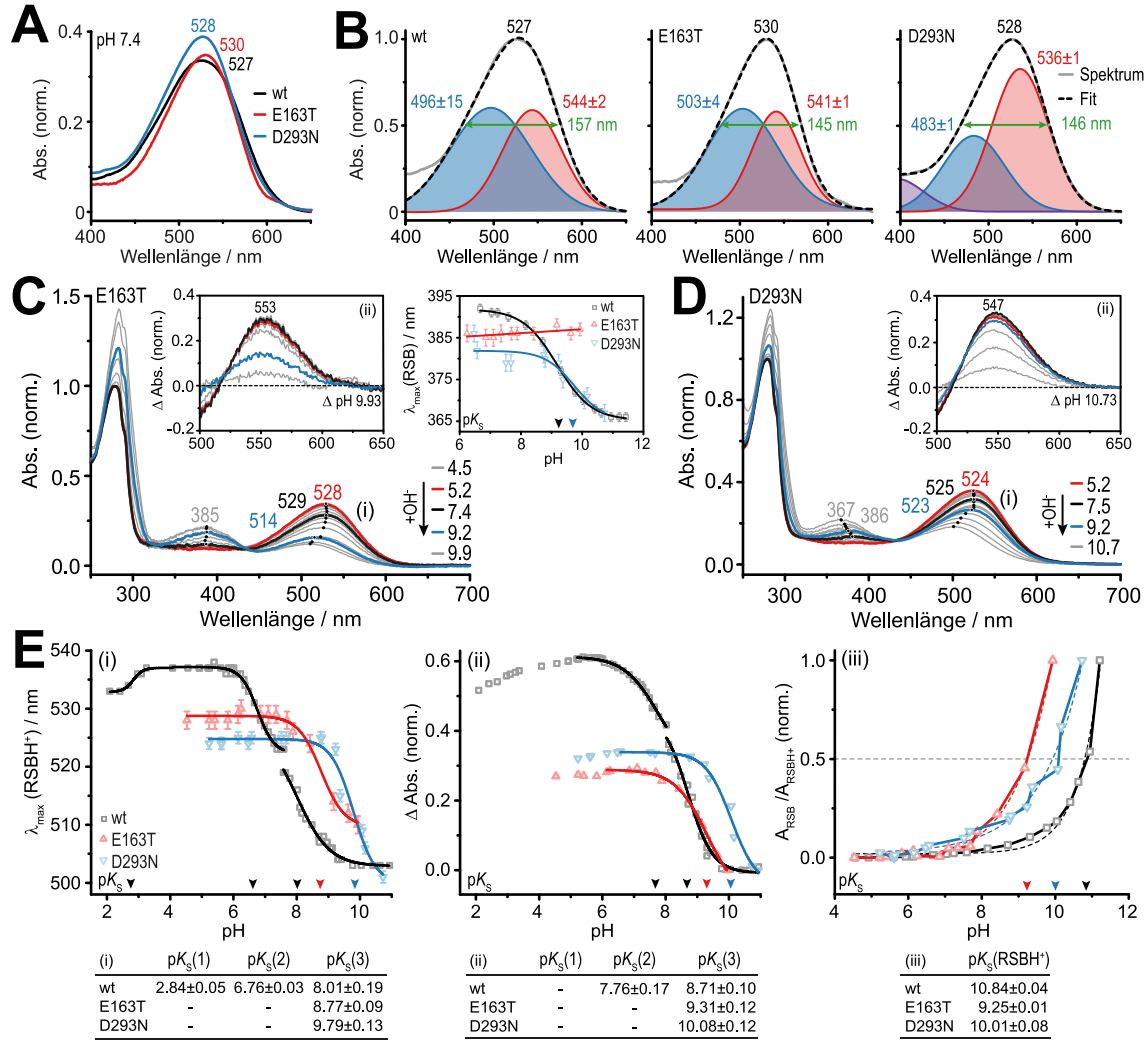


Abbildung 41: pH-Abhängigkeit von ReaChR-E163T und -D293N. **A)** Chromophorabsorption von ReaChR (schwarz), E163T (rot) und D293N (blau) und deren Absorptionsmaxima in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM normiert auf Absorption bei 280 nm. **B)** Gauß-Fits der Chromophorbande von WT (links, cf. Abbildung 30H, pH 7.4), E163T (Mitte) und D293N (rechts). Individuelle Glockenkurven (farbig) inkl. Maxima (grün) sowie deren kumulative Fitfunktion (gestrichelt) ist gezeigt. Halbwertsbreite der Chromophorpeaks wurde bestimmt (grün). pH-abhängige UV-vis-Spektren von E163T (**C**, pH 4.53 - 9.93) und D293N (**D**, pH 5.23 - 10.73) in Titrationspuffer (jeweils 10 mM Citrat, BTP & CAPS, 100 mM NaCl & 0.03 % (w/v) DDM). Absorptionsmaxima sind skizziert (schwarze Kreise) und für einzelne pH-Werte aufgelistet. Differenzspektren (pH X minus pH 9.93 (**C**, linker Einschub) bzw. pH 10.73 (**D**, Einschub)) wurden berechnet. pH-Titrationskurve (pH vs. Absorptionsmaxima) der deprotonierten RSB-Spezies (**C**, rechter Einschub). Datenpunkte (Symbole) wurden mit sigmoidalen Boltzmann-Funktionen (Linien) bzw. einer linearen Funktion (E163T) approximiert. pK_s -Werte wurden extrahiert (Pfeile). **E)** pH-Titrationskurven nach Methode 1 (pH vs. Absorptionsmaxima, i), Methode 2 (pH vs. Absorptionsänderung bei 553 nm (E163T) bzw. 547 nm (D293N), ii) und Deprotonierung der RSB (normiertes Verhältnis A_{385}/A_{528} (E163T) bzw. A_{367}/A_{524} (D293N), iii). Extrahierte pK_s -Werte sind tabellarisch zusammengefasst (unten). Wildtyp Daten aus Abbildung 30.

In Analogie zu früheren pH-Titrationsen (cf. Abbildung 26, Abbildung 30 & Abbildung 39) korreliert die Abnahme der Chromophorabsorption, auch in den Gegenionenmutanten, mit

der Deprotonierung der RSB im alkalischen Milieu. Die pK_s -Werte der $RSBH^+$ liegen bei 9.25 ± 0.01 und 10.01 ± 0.08 für E163T und D293N und sind somit gegenüber dem WT zu kleineren pH-Werten verschoben (Abbildung 41E, iii). Ähnliche Effekte wurden für BR berichtet (Marti, Rösselet *et al.* 1991) und implizieren einen kleineren Abstand von E163 zur RSB wie für D293. Im Gegensatz zu WT und D293N ist in E163T nach partieller Deprotonierung keine protochrome Verschiebung der gebildeten RSB-Spezies (D_{385}) zu beobachten (Abbildung 41C, rechter Einschub), was den Verdacht erhärtet, dass die pH-abhängige (De-)Protonierung von E163 die Farbverschiebung der deprotonierten RSB-Isoformen verursacht. Auf dieser Grundlage lässt sich auch eine Beteiligung von E163 an dem pH-Übergang der $RSBH^+$ -Formen (D_{535} und D_{503}) im WT vermuten. Letztgenannte Hypothese kann durch die Auswertung der pH-Titrationen weiter untermauert werden. Während ein WT-ähnlicher Übergang mit $pK_s = 8.77 \pm 0.09$ ($\Delta\lambda_{\max} = 19$ nm, Methode 1) bzw. 9.31 ± 0.12 (Methode 2) für E163T beobachtet wird, fehlt ein entsprechendes neutrales Pendant (Abbildung 41E, i & ii). Folglich weist E163 einen pK_s -Wert zwischen 6.8 - 7.8 und ist bei neutralem pH partiell protoniert. Mithilfe eines ungeladenen E163 bei pH 7.4 lässt sich auch die geringe bathochrome Verschiebung der E163T-Mutante erklären (*cf.* Abbildung 41A).

Weniger eindeutig stellt sich die Situation für die andere Gegenionenmutante (D293N) dar, in der auch kein neutraler Übergang identifiziert werden konnte (Abbildung 41E, i & ii). In CaChR1 hat die korrespondierende Mutation (D299N) eine Absenkung des pK_s -Werts des E163-homologen Glutamats um vier pH-Einheiten zur Folge (Li *et al.* 2014). Dadurch könnte der neutrale pK_s -Wert von E163 ins Saure ($< \text{pH } 5$) verschoben werden, sodass E163 innerhalb des Untersuchungsfensters (pH 5.23 - 10.73) seinen Protonierungszustand nicht ändern würde. Die einzige (De-)Protonierungsreaktion in D293N wird mit einem $pK_s = 9.79 \pm 0.13$ ($\Delta\lambda_{\max} = 24$ nm, Methode 1) bzw. 10.08 ± 0.12 (Methode 2) beobachtet (Abbildung 41E, i & ii) und liegt damit sehr nahe beim pK_s -Wert der $RSBH^+$. Neben dieser Interpretation wäre es ebenfalls möglich, dass es sich um die basische Deprotonierung eines anderen Restes handelt, welcher mit der Dissoziation des RSB-Protons einhergeht.

Transiente UV-vis-Spektroskopie von E163T und D293N

Im folgenden Abschnitt erfolgte die Charakterisierung der Photozyklen der Gegenionenmutanten. Nach Laseranregung ($\lambda_{\text{exz}} = 530$ nm) ist zum Zeitpunkt der maximalen Auflösung von 40 ns bereits das frühe zum Dunkelzustand rot-verschobene K-Intermediat detektierbar, welches für beide Mutanten mit einer ähnlichen Halbwertszeit ($t_{1/2}$) in den L-Zustand übergeht (Abbildung 42A, B). Letztgenannter zeigt für die beiden untersuchten Proben aber deutlich unterschiedliche Lebenszeiten. Während L in E163T gegenüber dem WT ca. 1.7fach länger populiert wird, ist der blau-verschobene Zustand in D293N sogar mehr als 20 Mal länger existent (Abbildung 42D). Dieser Prozess korreliert mit der verzögerten Bildung des M-Intermediats, d.h. der Deprotonierung der RSB. Es ist daher anzunehmen, dass die beiden Gegenionen, vor allem D293, als Akzeptor des Protons der RSB in ReaChR fungieren. Die nachfolgende Reprotonierung der RSB ist weit weniger kinetisch beeinflusst

($t_{1/2}(M \rightarrow N)$): WT = 6.54 ± 0.64 ms; E163T = 8.54 ± 0.27 ms; D293N = 12.7 ± 0.2 ms). Im Gegensatz zu der Retardierung der ersten Hälfte des Photozyklus ist der $N \rightarrow O$ - sowie der $O \rightarrow D$ -Übergang in beiden Mutanten im Vergleich zum WT deutlich beschleunigt, wobei E163T die schnellsten Kinetiken aufweist.

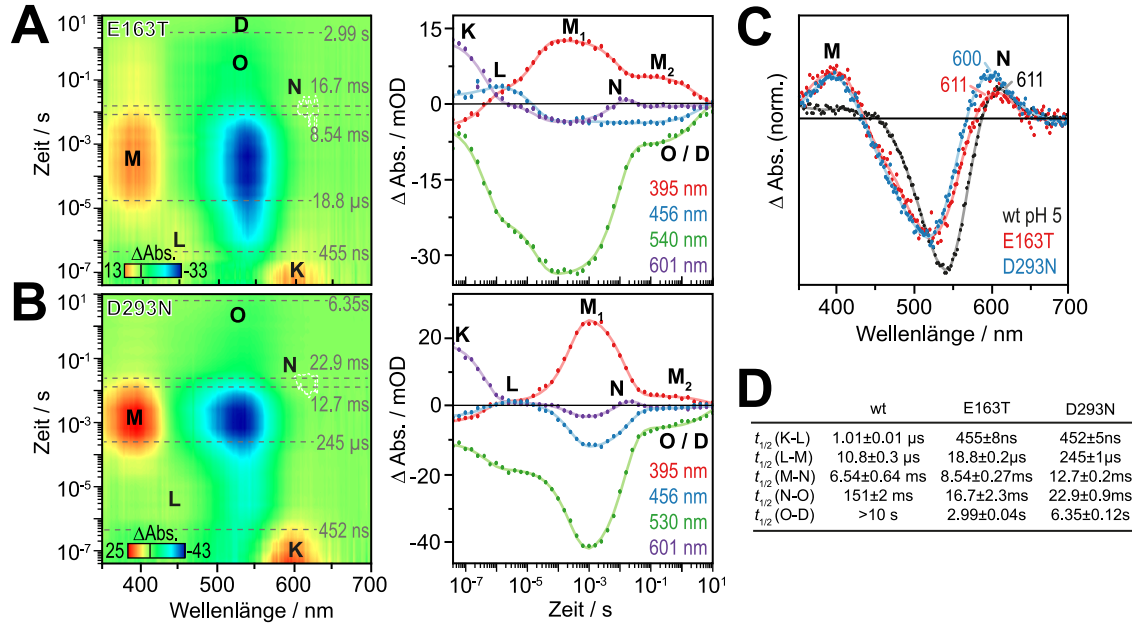


Abbildung 42: Transiente UV-vis-Spektroskopie von ReaChR-E163T und -D293N. UV-vis-Spektroskopie nach Laseranregung (530 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 7.69 mHz) von rekombinantem E163T (A) und D293N (B) in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) von Proben einer optischen Dichte von $A_{280} = 1.0$ wurden zwischen 40 ns und 10 s (11 Zyklen) detektiert. Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue gestrichelte Linien, links) wurden nach SVD-Zerlegung durch globale Analyse mit jeweils fünf Komponenten ermittelt. Einzelne SVD-rekonstruierte Datenpunkte konkreter Wellenlängen (Kreise) sowie deren globaler Fit (Linien) wurden extrahiert (rechts). C) Normierte EADS der N-Zustände von E163T (rot), D293N (blau) und WT bei pH 5 (schwarz, Abbildung 31E). Absorptionsmaxima sind illustriert. D) Tabellarischer Vergleich der beobachteten spektralen Übergänge sowie deren Kinetiken. WT-Werte aus Abbildung 31B.

In den Einzelwellenlängen-Kinetiken ist ein biphasischer Zerfall des M-Zustands für E163T und D293N zu verzeichnen (Abbildung 42A, B, rechts), welcher zwei deprotonierte Zustände (M_1 & M_2) suggeriert. Während M_1 im Zuge der Reprotonierung in den N-Zustand übergeht, verbleibt eine nicht unerhebliche Fraktion in seiner deprotonierten Form (M_2). Dabei korreliert der Zerfall von M_2 zeitlich mit der Bildung des O- bzw. D-Zustands, so dass auch eine Konversion von M nach D angenommen werden muss. Folglich könnten zwei separate Wege den Dunkelzustand repopulieren. Die Reaktionssequenz $M_1 \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow D$ wird als Hauptphotozyklus angenommen, wobei der Anteil der Rückkehr über den Seitenarm ($M_2 \rightarrow D$) in den beiden Mutanten unterschiedlich ausfällt.

Da der N-Zustand von E163T gegenüber dem WT quasi nicht verschoben ist ($\lambda_{\max}(\Delta \text{Abs.})$: WT = 611 nm (pH 5); E163T = 611 nm), kann eine ähnliche elektronische Stabilisierung der RSBH⁺ in diesem Intermediat angenommen werden (Abbildung 42C). Daher liegt die Vermutung nahe, dass E163 bei neutralem pH in zumindest größtenteils protonierter,

d.h. ungeladener, Form vorliegt. Im Gegensatz dazu scheint die RSBH⁺ in D293N besser stabilisiert zu werden, was sich durch eine 10 nm hypsochrome Verschiebung des Spektrums äußert. Die Beobachtung könnte durch die Einführung einer weiteren negativen Ladung nahe der RSB erklärt werden, z.B. durch Deprotonierung des ansonsten ungeladenen E163 in D293N.

3.3.11 Schwingungsspektroskopie

Charakterisierung von frühen Photozyklusintermediaten

Unter kryostatischen Bedingungen lassen sich frühe Intermediate des Photozyklus von ChRs stabilisieren und ihre spektroskopischen Eigenschaften untersuchen (Ritter *et al.* 2008). Für die Korrelation spektraler Intermediate zu zugrunde liegenden Konformationsänderungen wurden photostationäre Zustände (LED-Belichtung ~ 530 nm) von ReaChR bei Temperaturen von 80 bis 293 K mit UV-vis- und FTIR-Differenzspektroskopie (Licht minus Dunkel) analysiert. Zwischen 80 und 200 K ist der K-Zustand die dominante Spezies während bei Temperaturen > 200 K hauptsächlich L akkumuliert wird (Abbildung 43B). Eine kurzwellige Schulter bei ca. 210 K könnte auf die Koexistenz des deprotonierten M-Intermediats hinweisen, dennoch tritt es, wenn überhaupt, nur als Subpopulation auf. In Analogie zu den transienten UV-vis-Messungen bei pH 7.4 (*cf.* Abbildung 31B) wurde der reprotonierte N-Zustand nicht beobachtet.

Bei Temperaturen von 150 und 240 K sind die beiden frühen Zustände K und L maximal angereichert. Daher wurden FTIR-Experimente zur Charakterisierung assoziierter Konformationsänderungen bei diesen Temperaturen durchgeführt (Abbildung 43A). Das Differenzspektrum bei 150 K (K minus D) zeigt moderate Signale im Amid I- ($\nu = 1700 - 1620$ cm⁻¹, $\nu(\text{CO}_2\text{H})$) und Amid II-Bereich ($\nu = 1570 - 1510$ cm⁻¹, $\nu(\text{C-N})$ & $\delta(\text{N-H})$), welche initiale strukturelle Änderungen im Proteinrückgrat (Goormaghtigh *et al.* 1994) sowie Hydratisierung von α -helikalen Strukturen (Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2015) innerhalb des Photorezeptors implizieren. Ein markantes Bandenmuster bei 1186(+), 1201(-) & 1232(-) cm⁻¹ im Retinal-Fingerprint-Bereich suggeriert die Isomerisierung des Retinal-Chromophors von all-*trans* nach 13-*cis* (Nack *et al.* 2009; Ito *et al.* 2014). Besonders auffällig ist eine stark ausgeprägte positive HOOP-Bande (engl. *hydrogen-out-of-plane*) bei 968 cm⁻¹. Wie für andere mikrobielle Rhodopsine, kann sie als Indiz für einen verdrillten und gespannten Cofaktor nach der Photoisomerisierung angesehen werden (Eyring *et al.* 1982; Smith *et al.* 1985). In Analogie zu BR ($\delta(\text{C-H}) = 969$ cm⁻¹) wäre eine Zuordnung zur C₁₅-H-Bindung möglich (Maeda *et al.* 1991).

Anhand der fehlenden HOOP-Bande im L-Differenzspektrum wird auf eine relaxierte(re) Chromophorkonfiguration geschlossen. Erkenntlich an der Signalamplitude im Amid I-Bereich geht die Evolution der blau-verschobenen Spezies mit großen Konformationsänderungen des Proteinrückgrats einher. Diese könnten durch die Kanalvoröffnung und einen eventuellen Wassereinstrom in neu gebildete Kavitäten verursacht werden. Die spektrale Blauverschiebung des Dunkelzustands ($\lambda_{\text{max}} = 527$ nm) nach

L ($\lambda_{\max} = 495$ nm, cf. Abbildung 31F) ist in Übereinstimmung mit der Verschiebung der ethylenischen C=C-Valenzschwingung von $1526(-)$ cm^{-1} nach $1542(+)$ cm^{-1} (Aton *et al.* 1977; van den Berg *et al.* 1990). Das FTIR-Spektrum von L zeigt eine zusätzliche positive Bande bei 1241 cm^{-1} , welche entweder einer Streckschwingung der C₁₂-C₁₃-Bindung des Retinals (Smith *et al.* 1987; Stensitzki *et al.* 2016) oder einer N-H-Spreizschwingung (engl. *bending*) der RSB zugeordnet werden könnte (Hashimoto *et al.* 2010).

Im photostationären Zustand bei 293 K ist die C=C-Streckschwingung bei $1542(+)$ cm^{-1} schwächer ausgeprägt, was sich gut mit der geringeren Akkumulation des L-Zustands bei Raumtemperatur begründen lässt. Ansonsten sind die vibronischen Elemente im Fingerprint- und Amid I-Bereich entsprechend konserviert. Protontransferprozesse von sauren Aminosäureseitenketten werden in einem späteren Abschnitt behandelt.

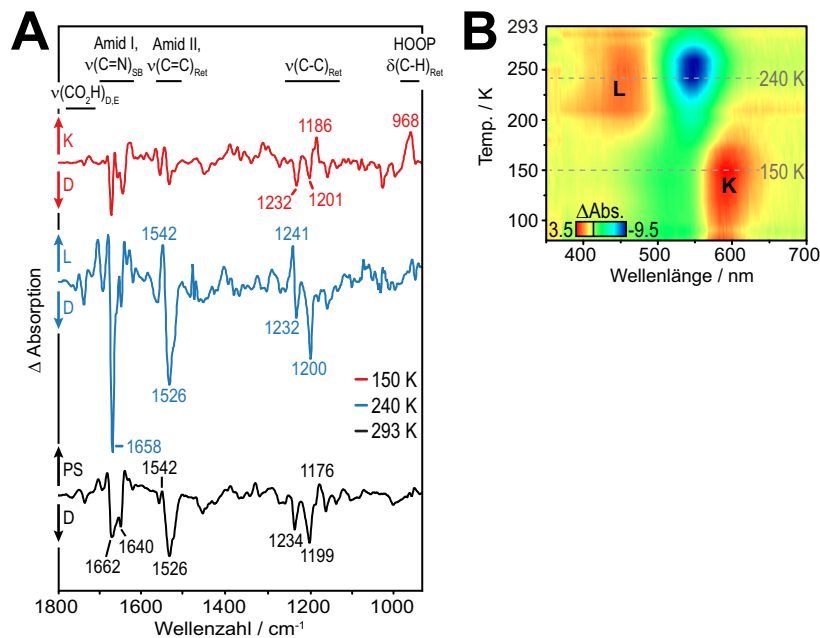


Abbildung 43: FTIR-Charakterisierung von frühen Photozyklusintermediaten in ReaChR. **A)** Kryostatische FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf Retinal-Bande bei $\sim 1234(-)$ cm^{-1}) des photostationären Zustands unter kontinuierlicher Belichtung (~ 530 nm, LEDs) von aufgereinigtem ReaChR (DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM) bei $T = 150$ K (rot), 240 K (blau) und 293 K (schwarz). Schwingungsbereiche von bestimmten funktionellen Gruppen sind indiziert. HOOP, engl. *hydrogen-out-of-plane*-Schwingung. **B)** Korrespondierende UV-vis-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 80 und 293 K. Proteinaufreinigung wurde von Benjamin Krause und Messungen sowie Datenprozessierung von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt.

Photostationäre Zustände von ReaChR und Mutanten

Im spektralen Bereich zwischen $1570 - 1510$ cm^{-1} sind neben den Amid II-Schwingungen hauptsächlich Vibrationen der ethylenischen C=C-Doppelbindungen des Retinal-Chromophors zu beobachten. Die Lage der C=C-Banden ($\nu(\text{C}=\text{C})$) im FTIR-Differenzspektrum ist antiproportional zu den Absorptionsmaxima (λ_{\max}) der zugrunde liegenden Zustände (Aton *et*

al. 1977; van den Berg *et al.* 1990; Neumann-Verhoeven *et al.* 2013). Um die Zusammensetzung des photostationären Zustands des WT sowie einiger Mutanten (E130Q, E163T, D293N & D196N) bei 293 K abzuschätzen, wurden die jeweiligen Daten mit zeitaufgelösten UV-vis-Differenzspektren verglichen (Abbildung 44).

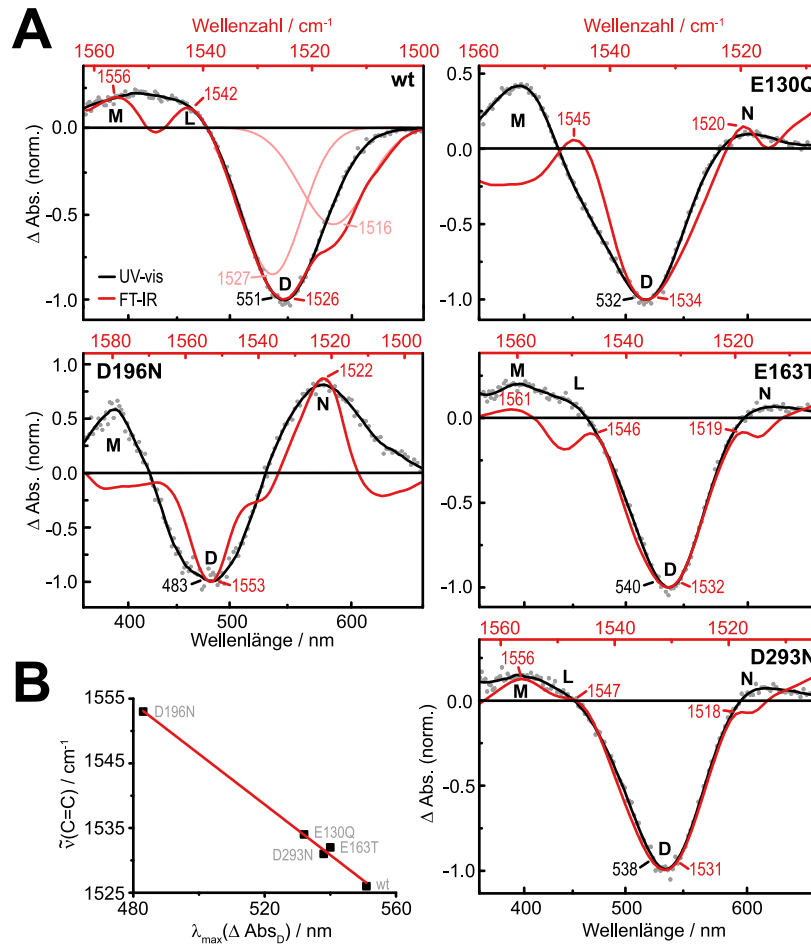


Abbildung 44: Spektrale Zusammensetzung der photostationären Zustände von ReaChR und Mutanten. **A)** FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf $\nu(\text{C}=\text{C})$) des photostationären Zustands ($\sim 530 \text{ nm}$, LED) von ReaChR und einigen Mutanten in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM und 20 °C. Überlagerung der ethylenischen C=C-Streckschwingung des Retinal-Moleküls (*rot*) mit zeitaufgelösten UV-vis-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert, Abszisse ist invers logarithmisch skaliert): wt = 40 μs ; D196N = 1 s; E130Q = 100 ms; E163T = 6.31 μs ; D293N = 15.8 μs . Rohdaten (*graue Punkte*) und Fit (*schwarze*) sind gezeigt. Negative Bande des WT-FTIR-Spektrums wurde mit zwei Gauß-Kurven gefittet (*schwach rot*). Vollständige FTIR-Spektren zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} sind im Appendix illustriert (*cf.* Abbildung A 10). **B)** Korrelation zwischen C=C-Streckschwingungen und negativer Absorptionsmaxima der UV-vis-Differenzspektren ($\lambda_{\text{max}}(\Delta \text{Abs}_D)$). Datenpaare (*schwarze Rechtecke*) wurden mit linearem Fit (*rot*) angenähert. Proteinaufreinigung sowie Korrelation wurde von Benjamin Krause und Messungen sowie Datenprozessierung von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt.

Die Überlagerung der FTIR- und UV-vis-Differenzspektren des WT liefern eine gute Übereinstimmung der positiven Banden. Folglich trägt neben dem L- ($\nu(\text{C}=\text{C}) = 1542(+)$ cm^{-1} ; $\lambda_{\text{max}}(\Delta \text{Abs}) \sim 450 \text{ nm}$) auch das M-Intermediat ($\nu(\text{C}=\text{C}) = 1556(+)$ cm^{-1} ; $\lambda_{\text{max}}(\Delta \text{Abs}) \sim 400 \text{ nm}$) anteilig zum photostationären Zustand bei. Die negative Dunkelbande weist neben ihrem

Hauptminimum bei 1526 cm⁻¹ eine niederfrequente, d.h. rote Schulter auf. Durch Annäherung mittels Gauß-Funktionen lassen sich zwei Spezies bei 1527(-) und 1516(-) cm⁻¹ extrahieren, wobei nur das Hauptminimum mit dem Ausbleichen des Dunkelzustands im UV-vis-Differenzspektrum bei 551 nm korreliert. Die molekulare Natur der beiden IR-Komponenten könnte den zwei Grundzustandsisomeren des Retinals (13-*trans*,15-*anti* & 13-*cis*,15-*syn*) entsprechen und für einen heterogenen Dunkelzustand votieren. Weder in den transienten UV-vis- noch in den stationären FTIR-Messungen des WT ist eine positive rot-verschobene Bande zu beobachten.

Dies steht im Kontrast zu der D196N-Mutante, welche eine dominante positive Bande bei 1522 cm⁻¹ zeigt. Durch Korrelation mit den zeitaufgelösten UV-vis-Spektren lässt sich diese dem rot-verschobenen N-Zustand zuordnen. Die FTIR-Dunkelzustandsbande ist gegenüber dem WT um 27 cm⁻¹ in den hochfrequenten Bereich verschoben (ν = 1553(-) cm⁻¹) und korreliert mit dem maximalen Ausbleichen des Chromophors im blauen Spektralbereich ($\lambda_{\text{max}}(\Delta\text{AbsD})$ = 483 nm). Ob die starke Akkumulation des reprotonierten N-Intermediats bzw. dessen korrespondierende Bande bei 1522(+) cm⁻¹ eine Konsequenz der starken hypsochromen Verschiebung des Dunkelzustands oder der durch die Mutagenese beeinträchtigten Protontransferreaktionen, z.B. Reprotonierung der RSB, ist, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten. Zumindest ist ein analoges doppeltes IR-Bandenmuster (1552(-) & 1529(+) cm⁻¹) auch in der homologen Mutante (D195N) in Chimären der blau-absorbierenden CrChR1 und CrChR2 zu beobachten (Inaguma *et al.* 2015).

In E130Q zeigt sich neben einer positiven N-Zustandsbande bei 1520 cm⁻¹ auch eine kleine Bande bei 1545(+) cm⁻¹. Im Vergleich zum WT könnte es sich um residuales L handeln, welches allerdings in den transienten UV-vis-Experimenten nicht beobachtet wurde (cf. Abbildung 40A). Die negative C=C-Streckschwingungsbande von E130Q ist gegenüber dem WT um 8 cm⁻¹ blau-verschoben. Die korrespondierende negative UV-vis-Dunkelbande von E130Q, ist ebenfalls um knapp 20 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Die beobachtete hypsochrome Verschiebung von E130Q zum WT deckt sich mit den bereits vorgestellten Befunden der stationären UV-vis-Spektroskopie ($\Delta\lambda_{\text{max}}$ = 14 nm) (cf. Abbildung 39A).

Im photostationären Zustand der Gegenionenmutanten (E163T & D293N) wurden ausschließlich positive IR-Banden im spektralen Bereich des M-Zustands detektiert. Da sich Signale von entsprechenden L- und N-Intermediaten nur als lokale Maxima von negativen Banden erahnen lassen, wird eine geringe spektrale Beteiligung am photostationären Zustand angenommen. Interessanterweise ist das Ausbleichen des Dunkelzustands, sowohl in E163T als auch in D293N im Vergleich zum WT, blau-verschoben. Auch wenn die Korrelation nur einen indirekten Schluss über das eigentliche Dunkelabsorptionsmaximum zulässt, widerspricht das Ergebnis den stationären UV-vis-Spektren ihrer IDAs, welche eine geringe Rotverschiebung ($\Delta\lambda_{\text{max}}$ = 1 - 3 nm) gegenüber dem WT zeigten (cf. Abbildung 41A).

In einer Korrelation von zeitaufgelösten mit photostationären Spektren bei Raumtemperatur wurde für CrChR2 das späte P₄₈₀ (O-Zustand in ReaChR) als Hauptbestandteil des photostationären Zustands ausgemacht (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013). Neben den oben

identifizierten kurzlebigeren Intermediaten kann dieselbe Situation auch für ReaChR angenommen werden. Da das O-Intermediat gegenüber dem Dunkelzustand spektral nicht verschoben ist (*cf.* Abbildung 31B), lässt sich diese Aussage nicht anhand der C=C-Streckschwingungen verifizieren. Durch die Bildung eines späten, bei gleichen Wellenlängen absorbierenden Zustands, würde sich nur die Amplitude der negativen Bande im Differenzspektrum aufgrund von Überlagerung verkleinern. Da zur besseren Vergleichbarkeit auf $\nu(\text{C}=\text{C})$ der einzelnen Spektren normiert wurde, können solche Prozesse dieser Repräsentationsform nicht entnommen werden. Wie bereits für andere Rhodopsine postuliert, lässt sich auch für ReaChR und Mutanten eine lineare Korrelation zwischen Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{max}}(\Delta\text{Abs}_D)$) und ethylenischer Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{C})$ aufzeigen (Abbildung 44B).

Chromophorstruktur in ReaChR und Mutanten

Im Folgenden wurde der Einfluss von Mutationen des Zentralen Tors (E130Q), des Gegenionenkomplexes (E163T & D293N) sowie des DC-Paars (D196N) auf die Chromophorstruktur von ReaChR untersucht. Wie bereits gezeigt, weist der Retinal-Cofaktor im frühen K-Intermediat des Wildtyps eine erhebliche Spannung bzw. Distorsion auf (*cf.* Abbildung 43A). Die charakteristische HOOP-Bande zeigt in der D196N- und D293N-Mutante bei 80 K (D→K-Übergang) eine vergleichbare Amplitude (Abbildung 45, *links*), ist jedoch in E130Q und E163T schwächer ausgeprägt. Vor allem in der Gegenionenmutante E163T ist bei 80 K kaum ein positives Signal zu identifizieren. Anscheinend liegt die prosthetische Gruppe in den beiden Mutanten, besonders in E163T, in einer entspannteren Konfiguration vor. Im Umkehrschluss lässt sich daher postulieren, dass E163 im WT mit zu der Spannung des Polyens im K-Zustand beiträgt. Diese Hypothese erscheint für das Gegenion, aufgrund der räumlichen Nähe zur RSB, plausibel. Für E130Q scheint ein indirekter Mechanismus wahrscheinlicher. In Analogie zum EHT-Modell (*cf.* Abbildung 10B) wäre im Rahmen der Photoaktivierung eine Umorientierung des eingebrachten Glutamins in E130Q denkbar. Infolgedessen könnte Glutamin 130 mit E163 wechselwirken und so die partielle Relaxation des Chromophors im K-Zustand bewirken.

Das Bandenmuster aus zwei negativen *trans*- (1199 & 1234 cm^{-1}) und einer positiven *cis*-Retinal-Bande (1176 cm^{-1}) ist bei Raumtemperatur ebenfalls in den Mutanten E130Q, E163T und D293N konserviert (Abbildung 45, *rechts*). Lediglich zeigt die Bande bei 1176(+) cm^{-1} in E130Q eine im Vergleich zum WT leicht vergrößerte Amplitude. Bemerkenswerterweise ist in dem Differenzspektrum von D196N eine zusätzliche negative Bande bei 1183 cm^{-1} sowie eine markante positive Bande bei 1173 cm^{-1} auszumachen. Erstere impliziert die Koexistenz eines 13-*cis*-Chromophors im Dunkelzustand (Smith *et al.* 1987; Kawanabe & Kandori 2009; Ogren *et al.* 2014; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015) und letztere weist auf die lichtinduzierte Bildung eines 13-*trans*-Photoprodukts hin (Miranda *et al.* 2009; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Es liegt also nahe, dass im apparenten Dunkelzustand (DA_{app}) neben dem Hauptisomer 13-*trans*, 15-*anti* auch 13-*cis*, 15-*syn* vorliegt, und D196N die Anreicherung des Nebenisomers

fördert. Diese Annahme deckt sich mit den großen spektralen Änderungen zwischen IDA und DA_{app} (Lichtadaptation) von D196N (*cf.* Abbildung 38A, B).

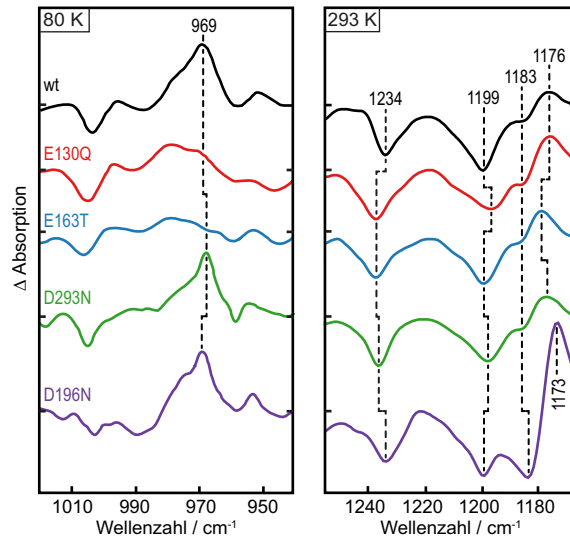


Abbildung 45: Chromophorstruktur in ReaChR und Mutanten. FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf Retinal-Bande bei 1234(-) cm^{-1}) des photostationären Zustands (~ 530 nm, LED) von ReaChR und einigen Mutanten in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM und 80 K (*links*) bzw. 293 K (*rechts*). Vollständige Spektren zwischen 1800 und 1000 bzw. 900 cm^{-1} sind im Appendix illustriert (*cf.* Abbildung A 10).

Protontransferprozesse in ReaChR

Carbonylgruppen von protonierten sauren Aminosäureseitenketten absorbieren in einem hochfrequenten Spektralbereich zwischen 1780 und 1700 cm^{-1} . Aufgrund der geringen Anzahl dieser funktionellen Gruppen im Protein, kommt es zu geringeren Überlagerungsphänomenen und die einzelnen Reste können per ortsgerichteter Mutagenese zuverlässig zugeordnet werden. Da sie häufig eine funktionelle Rolle innerhalb des Ionentransports spielen, ist die Zuordnung essentiell für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus.

Im D \rightarrow K-Übergang, welcher bei 80 K beobachtet wird (*cf.* Abbildung 43B), wurde für den Wildtyp zwei positive (1713 & 1729 cm^{-1}) und eine negative Bande (1721 cm^{-1}) detektiert (Abbildung 46A, *links*). Nach H/D-Austausch verschieben sich die Banden bei 1729(+) und 1721(-) cm^{-1} um 8 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen. Durch Überlagerung von residualem nichtdeutertem Protein bei 1721(-) cm^{-1} spaltet die deuterierte Bande bei ca. 1720(+) cm^{-1} in zwei Maxima bei 1719 und 1725 cm^{-1} auf. Während das WT-Bandenmuster in den beiden Gegenionenmutanten und in D196N nahezu konserviert vorliegt, ist es für E130Q nicht zu beobachten. Dieser Befund legt die Zuordnung dieser Carbonylstreckschwingung zu E130 nahe. Da die positive und die negative Bande gleichermaßen von der Aminosäuresubstitution und dem H/D-Austausch beeinflusst werden, wird eine Wasserstoffbrückenbindungsänderung von E130,

anstelle einer Deprotonierung von E130 und einer Protonierung eines unbekannten Glutamats bzw. Aspartats angenommen (Abbildung 46B). Für das homologe E90 in CrChR2 wurde anhand von Computersimulationen die Reduktion von zwei auf eine Wasserstoffbrücke nach Belichtung postuliert (Kuhne *et al.* 2015). Dieser Mechanismus konnte für ReaChR hier experimentell verifiziert werden. Die Sensitivität gegenüber D₂O von E130 lässt sich gut mit der Nähe zu dem (mit wassergefüllten) extrazellulären Halbkanal erklären (Kato *et al.* 2012). Die Natur der positiven Bande bei 1713 cm⁻¹ bleibt im Rahmen der Mutagenesestudie ungeklärt.

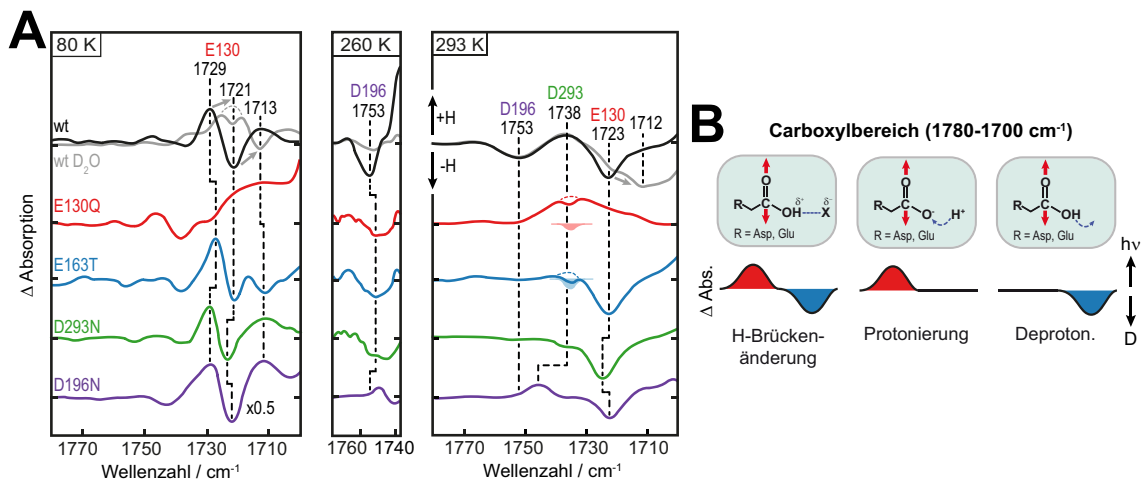


Abbildung 46: Protontransferprozesse in ReaChR. A) FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf Retinal-Bande bei 1234(-) cm⁻¹) des photostationären Zustands (~530 nm, LED) von ReaChR und einigen Mutanten in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM bei 80 K (*links*), 260 K (*Mitte*) bzw. 293 K (*rechts*). Bandenverschiebungen durch H/D-Austausch sind angezeigt (*graue Pfeile*). Vermutliche Maxima (*gestrichelte Linie*) und die vermuteten negativen Banden sind skizziert (*farbige Fläche*). Schwingungsbanden wurden konkreten Aminosäuren zugeordnet. Vollständige Spektren zwischen 1800 und 1000 bzw. 900 cm⁻¹ sind im Appendix illustriert (*cf.* Abbildung A 10). Proteinaufreinigung wurde von Benjamin Krause und Messungen sowie Datenprozessierung von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt. **B)** Simplifizierte Demonstration der Evolution und Involution von Carbonylschwingungen der Glutamin- und Asparaginsäureseitenkette innerhalb von FTIR-Differenzspektren in Abhängigkeit von deren Protonierungszustand.

Bei Raumtemperatur (293 K) lassen sich für den WT drei Schwingungsbanden bei 1723(-), 1738(+) und 1753(-) cm⁻¹ identifizieren (Abbildung 46A, *rechts*). Obwohl wiederum keine quantitative Austauschrate in schwerem Wasser erzielt wurde bzw. werden konnte, verschiebt sich die Bande bei 1723(-) cm⁻¹ partiell um 9 cm⁻¹ in den niederfrequenten Bereich. Aufgrund der Insensitivität der anderen beiden Banden liegt die Vermutung nahe, dass sich die zugrunde liegenden Reste innerhalb des Proteins befinden und im Rahmen des Photozyklus nicht mit der wässrigen Phase in Kontakt treten. Die Differenzspektren der Mutanten bestätigen die initiale Bandenzuordnung aus den kryostatischen Messungen bei 80 K (E130: 1721(-) cm⁻¹), da in E130Q keine negative Bande bei 1723 cm⁻¹ zu beobachten ist. Im Gegensatz zur frühen Phase des Photozyklus (80 K: D→K) erfährt E130 bei 293 K nun eine Deprotonierung. E130Q zeigt, wie die deuterierte Probe des WT, zwei positive Maxima (1731 & 1739 cm⁻¹), welche durch Überlagerung einer negativen Bande, d.h. Deprotonierung einer hier nicht charakterisierten Glutamin- bzw. Asparaginsäure, mit ähnlichem ν_{max} zustande kommen könnte.

Die weitere Zuordnung stellt sich allerdings schwieriger dar, da die positive Bande bei 1738 cm^{-1} durch die Aminosäuresubstitutionen von E163 und D293 reduziert ist. In den transienten UV-vis-Messungen der Gegenionenmutanten war für beide, aber besonders für D293N, eine retardierte Bildung des deprotonierten M-Zustands zu beobachten (*cf.* Abbildung 42). Dieser Befund spricht für einen Protontransfer von der RSBH⁺ zu den Gegenionen, hauptsächlich D293, im spektralen Übergang von L→M im WT und unterstützt die Zuordnung der positiven Bande bei $1738(+)\text{ cm}^{-1}$ zum Gegenion D293. Zusätzlich kann aufgrund der geringen bathochromen Verschiebung ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 3\text{ nm}$) des Dunkelspektrums von E163T gegenüber dem WT (*cf.* Abbildung 41A), des nichtverschobenen N-Differenzspektrums in der Mutante (*cf.* Abbildung 42C) und der pH-Titrations ($\text{p}K_{\text{s}}(\text{E163}) = 6.8 - 7.8$, *cf.* Abbildung 41) auf ein zumindest partiell protoniertes E163 im Dunkelzustand bei pH 7.4 geschlossen werden. Falls sich der Protonierungszustand von E163 im Photozyklus nicht ändern würde, wäre keine Schwingung der protonierten Carboxylgruppe im Differenzspektrum (Licht minus Dunkel) zu erwarten.

Unabhängig von der UV-vis-spektroskopischen Zuordnung, stellt sich dennoch die Frage, warum in beiden Gegenionenmutanten, keine positive Bande bei $1738(+)\text{ cm}^{-1}$ zu beobachten ist. Dies kann mit den Unterschieden der Zusammensetzung der photostationären Zustände der Mutanten im Vergleich zum WT anhand von veränderten (De-)Protonierungskinetiken begründet werden. Während in *CrChR2* unter kontinuierlicher Belichtung bei Raumtemperatur nahezu ausschließlich der späte P₄₈₀ (O-Zustand in *ReaChR*) im photostationären Zustand angereichert wird (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013), lassen sich für *ReaChR* zusätzliche Anteile an früheren Intermediaten wie L, M und N identifizieren (*cf.* Abbildung 43 & Abbildung 44). Im Gegensatz zu E130Q und D196N wurde für die Gegenionenmutanten keine positive rot-verschobene $\nu(\text{C}=\text{C})$ des N-Zustands im photostationären Zustand beobachtet (*cf.* Abbildung 44), d.h. dass sich das reprotonierte Intermediat bereits größtenteils in den nachfolgenden O-Zustand umgewandelt hatte. Diese Überlegung deckt sich gut mit den gegenüber dem WT ≤ 9 fach beschleunigten Kinetiken des N→O- und O→D-Übergangs (*cf.* Abbildung 42D). Da für *CrChR2* die Deprotonierung des primären H⁺-Akzeptors D253 im analogen N→O-Übergang (P₅₂₀→P₄₈₀) konstatiert wurde (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013), könnte im photostationären Zustand der Mutanten von *ReaChR* das korrespondierende D293 bereits wieder deprotoniert vorliegen. Alternativ könnten die Mutationen des Gegenionenkomplexes die Protonenaffinität bzw. den $\text{p}K_{\text{s}}$ -Wert des unveränderten Gegenions reduzieren und auf diese Weise eine vorzeitige, d.h. vor dem photostationären Zustand, Deprotonierung verursachen. Beide Szenarien würden bei Annahme eines deprotonierten D293 im Dunkelzustand das Ausbleiben einer positiven Bande im spektralen Fenster zwischen 1800 und 1700 cm^{-1} erklären. In Analogie zu E130Q bei 293 K, könnte eine fehlende Protonierungsbande in E163T auch durch die Überlagerung einer hypothetischen negativen Bande bei gleichem ν_{max} erklärt werden. Immerhin sind im Differenzspektrum zwei lokale Maxima zu beobachten.

In D196N ist die positive Bande um 10 cm^{-1} nach 1748 cm^{-1} verschoben, was eine schwächere Wechselwirkung des Chromophors zum Gegenionenkomplex suggeriert. Dies ließe

sich durch den heterogenen Dunkelzustand der Mutante mit einem höheren Anteil an 13-*cis*, 15-*syn*-Retinal argumentieren (cf. Abbildung 44).

Obwohl die negative Bande des WT bei 1753 cm⁻¹ in keiner der drei Mutanten bei 293 K detektiert wurde, konnte sie bei tieferen Temperaturen erfolgreich zugeordnet werden. In den Differenzspektren bei 260 K ist sowohl für E130Q, E163T als auch für D293N eine negative Bande auszumachen, jedoch nicht für D196N (Abbildung 46A, *Mitte*). Diese Beobachtungen erlauben die Zuordnung zu D196, welches demzufolge im photostationären Zustand in deprotonierter Form vorliegt. Um die fehlenden Bande in E130Q, E163T und D293N bei Raumtemperatur zu erklären, wird wiederum auf die schnelleren Kinetiken der drei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hingewiesen (cf. Abbildung 40B & Abbildung 42D). Es wäre also denkbar, dass D196 bei 293 K bereits wieder reprotoniert wurde und so sein Differenzsignal auslöscht. Da die Vibration bei 1753(-) cm⁻¹ nach H/D-Austausch nicht verschoben ist, wird vermutet, dass D196 keinen Zugang zur wässrigen Phase hat.

Photoaktives Cystein in ReaChR

Im hochfrequenten Spektralbereich zwischen 2600 und 2500 cm⁻¹ können Vibrationen der Thiolgruppe von Cysteinseitenketten detektiert werden. Da sie in verhältnismäßig geringer Anzahl im Protein vertreten sind und in einem Fenster absorbieren, welches frei von anderen intrinsischen Proteinschwingungen ist, lassen sich die Signale einigermaßen zuverlässig zuordnen.

Im FTIR-Differenzspektrum von ReaChR ist eine positive Bande bei 2544 cm⁻¹ zu beobachten (Abbildung 47B). Im Gegensatz zu C1C2 (Ito *et al.* 2014) und CaChR1 (Lórenzfónfría *et al.* 2014) zeigt sich im Spektrum von ReaChR keine komplementäre negative Bande, d.h. dass die beobachtete Schwingung erst im belichteten Zustand induziert wird. Das gezeigte Amplitudenspektrum (532 nm, Laseranregung, *rapid-scan*-Methode) klingt mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 300$ ms ab und kann daher primär mit dem Zerfall des N-Zustands ($t_{1/2}(N \rightarrow O) = 151$ ms, cf. Abbildung 31B) korreliert werden.

Anhand theoretischer Überlegungen bestehen drei Möglichkeiten wie eine Thiolgruppe mit dem übrigen Protein wechselwirken kann. Neben dem einfachsten Fall eines ungebundenen Restes, vermag die SH-Funktionalität entweder als Wasserstoffbrückenakzeptor oder als -donor zu fungieren (Abbildung 47B, *unten*), wobei die letztere Variante bevorzugt wird (Zhou *et al.* 2009). Die Interaktion kann dabei entweder interhelikal mit einem polarisierten Rest einer anderen Helix oder intrahelikal mit einem Sauerstoffatom des Proteinrückgrats gebildet werden (Zhou *et al.* 2009; Watanabe *et al.* 2012). Demzufolge reflektiert die SH-Valenzschwingung entweder die Änderungen der relativen Orientierung zweier Helices zueinander oder über eine Variation der Ganghöhe einer einzelnen Helix. Die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung, in der die Mercaptogruppe als Donor wirkt, lässt sich über die Bandenlage abschätzen. Während freie Thiole zwischen 2589 - 2578 cm⁻¹ absorbieren, werden schwach gebundene bei 2580 - 2575 cm⁻¹, moderat gebundene bei 2575 - 2560 cm⁻¹ und stark gebundene bei 2560 - 2525 cm⁻¹ detektiert (Bare *et al.* 1975; Li & Thomas 1991). Auf dieser Basis lässt sich die

lichtinduzierte Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung eines Cysteins in ReaChR postulieren.

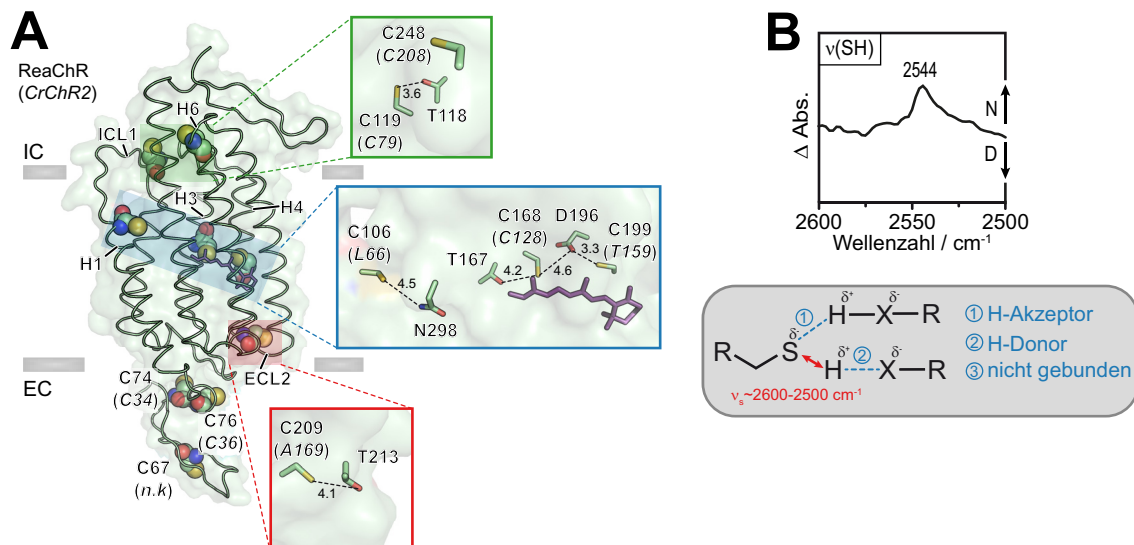


Abbildung 47: Photoaktives Cystein in ReaChR. **A)** SWISS-Model von ReaChR auf Basis der C1C2-Kristallstruktur (PDB: 3ug9) mit Fokus auf dessen neun Cysteinresten (Kalotten). Homologe Reste in CrChR2 in Klammern. Abstände in Å. n.k., nicht konserviert. **B)** FTIR-Amplitudenspektrum (rapid-scan-Methode, $t_{1/2} = 300$ ms) zwischen 2600 und 2500 cm^{-1} von ReaChR nach Laseranregung (532 nm, 20 mJ, 3 - 5 ns, Blitzfrequenz: 0.4 Hz) in Natriumchlorid-PBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM bei 15 °C. Mögliche Wechselwirkungen der Merkaptanseitenkette mit anderen Resten sind dargestellt. Das vollständige Spektrum zwischen 2600 und 1100 cm^{-1} befindet sich im Appendix (cf. Abbildung A 13B). Die Probenpräparation erfolgte von Benjamin Krause und die Infrarot-Spektren wurden von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr-Universität Bochum) aufgenommen

Es gilt nun zu klären, um welches Merkaptan es sich dabei handeln könnte. ReaChR trägt neun Cysteine (9 Cys auch in CrChR2), wobei drei im extrazellulären N-Terminus (C67, C74 & C76; nicht konserviert, C34 & C36 in CrChR2), eines im ECL2 (C209; A169 in CrChR2), zwei im hydrophoben Kern des Proteins (C168 & C199, DC-Paar; C128 & T159 in CrChR2), eines in der vermeintlichen Kanalpore zwischen Innerem und Zentralem Tor (C106; L66 in CrChR2) sowie zwei auf der intrazellulären Seite im ICL1 (C119; C79 in CrChR2) und in H6 (C248; C208 in CrChR2) lokalisiert sind (Abbildung 47A). Die N-terminalen Cysteine lassen sich leicht ausschließen, da sie zum einen in die Ausbildung von interprotomeren Disulfidbrücken involviert sind (Kato *et al.* 2012) und zum anderen aufgrund ihrer Exposition zum wässrigen Medium einen sehr kleinen Extinktionskoeffizient aufweisen müssten. Es hat sich gezeigt, dass der Extinktionskoeffizient der SH-Streckschwingung stark von der Polarität der Umgebung abhängt. In wässrigen Medien wurde ein Wert von $\epsilon \sim 5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, welcher allerdings in der hydrophoben Proteinumgebung um das 30fache ($\epsilon = 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ansteigen kann (Bare *et al.* 1975; Moh *et al.* 1987; Kozinski *et al.* 2008). Dieselbe Argumentation macht die beiden Kandidaten der Loopregionen (C119 und C209) weniger wahrscheinlich.

ESR-, Fluoreszenz-Anisotropie-Experimente sowie kryostatische Elektronenmikroskopie und Computersimulationen suggerierten die lichtinduzierte Bewegung

von H2, H6 und H7 in CrChR2 bzw. C1C2 (Krause *et al.* 2013; Sattig *et al.* 2013; Takemoto *et al.* 2015; Müller *et al.* 2015; Kuhne *et al.* 2015; Volz *et al.* 2016). Die helikalen Strukturänderungen würden für C119 (ICL1) und C248 (H6) sprechen. In FTIR-Spektren von CaChR1 wurde eine positive Thiolschwingung bei derselben Frequenz (2544(+) cm⁻¹) wie für ReaChR detektiert. Die Autoren ordneten die Streckschwingung der C168-analogen Aminosäure bzw. zwei Cysteinen in H2 zu (Lórenz-Fonfría *et al.* 2014). Die beiden Letzteren sind in ReaChR nicht konserviert. Kryostatische FTIR-Differenzspektren bei 77 K von C1C2 zeigten ein doppeltes Bandenmuster bei 2596(+) und 2577(-) cm⁻¹, welches ebenfalls mit dem C168-analogen Cystein assoziiert wurde (Ito *et al.* 2014). Beide FTIR-Studien kamen zum selben Schluss: Die Thiolvalenzschwingung rührt zumindest partiell von dem C168-Homolog. Infolgedessen wäre eine analoge Zuordnung für ReaChR durchaus plausibel. Nichtsdestotrotz sollte darauf hingewiesen werden, dass in ReaChR gegenüber C1C2 und CaChR1 zwei weitere Cysteine (C199 & C209; CrChR2: T159 & A169) vorliegen, welche im selben spektralen Fenster absorbieren könnten.

3.4 Markierung von ChRs mit unnatürlichen, IR-aktiven Aminosäuren

3.4.1 Expressionseigenschaften von markierten ChRs

Im folgenden Abschnitt wurde die nichtkanonische Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) *via* Stopp-Codon-Suppression (SCS) in diverse ChRs inkorporiert, um mittels Schwingungsspektroskopie den Mechanismus des Kanalschlusses und einhergehende Hydratisierungsänderungen zu untersuchen.

Es wurde ein orthogonales Paar aus einem Tyrosyl-tRNA-Hybrid aus *Homo sapiens* und *Bacillus stearothermophilus* mit CUA-Anticodon (tRNA_{CUA}) (Ye *et al.* 2008) und einer modifizierten *E. coli*-Tyrosyl-tRNA-Synthetase (aaRS_{azF}) (Deiters *et al.* 2003) verwendet. Da die Ausbeuten der Azidomutanten aufgrund der moderaten Suppressionseffizienz der Translationstermination zwischen 10 - 70 % des WT-Proteins liegen (Ye *et al.* 2008; Ye *et al.* 2009), wurde als erstes der Expressionsgrad von sechs verschiedenen ChRs und deren Y109azF-Homologen (C1C2-Nomenklatur) evaluiert. Y109 im Inneren Tor (*cf.* Abbildung 4B) wurde aus zweierlei Gründen als Referenz gewählt: Zum einen stellt es in der geschlossenen Konfiguration eine der beiden Konstriktionen der Ionenpore dar (Kato *et al.* 2012) und müsste bei Kanalöffnung entsprechende Konformations- bzw. Hydratisierungsänderungen erfahren. Zum anderen ist der Aminosäureaustausch des aromatischen Tyrosins mit dem azF nahezu sterisch äquivalent, demzufolge wenig invasiv.

Das zu supprimierende Amber-Codon (TAG) wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese an der korrespondierenden Position im ChR-Gen platziert. Um die Translation von C-terminal verlängerten Varianten zu verhindern, wurden native Amber-Codons am 3'-Ende des Zielgens durch Ochre-Codons (TAA) ersetzt. Anschließend wurden die WT-Proteine und die Azidomutanten in HEK293T exprimiert (Transfektion mit Lipofectamine (LTX) &

PLUS-Reagenz, cf. Kapitel 2.4.18) und mittels Immunoaffinitätschromatographie (1D4) aufgereinigt (cf. Abbildung 49A, ohne SPAAC). Die Lipofektion von HEK293T mit den drei benötigten Plasmiden mit dem Reagenz TurboFect resultierte in deutlich geringeren Ausbeuten der Azidomutanten im Vergleich zu Lipofectamine. Eine nicht erfolgte Amber-Suppression am künstlich eingebrachten TAG-Codon zieht die Bindung der eukaryotischen Freisetzungsfaktoren eRF1/eRF3 und die vorzeitige Termination der Translation nach sich (Bertram *et al.* 2001). Resultierende verkürzte Polypeptidketten werden wegen fehlendem C-terminalen Epitop (TETSQVAPA) nicht vom 1D4-Antikörper gebunden und dementsprechend nicht angereichert.

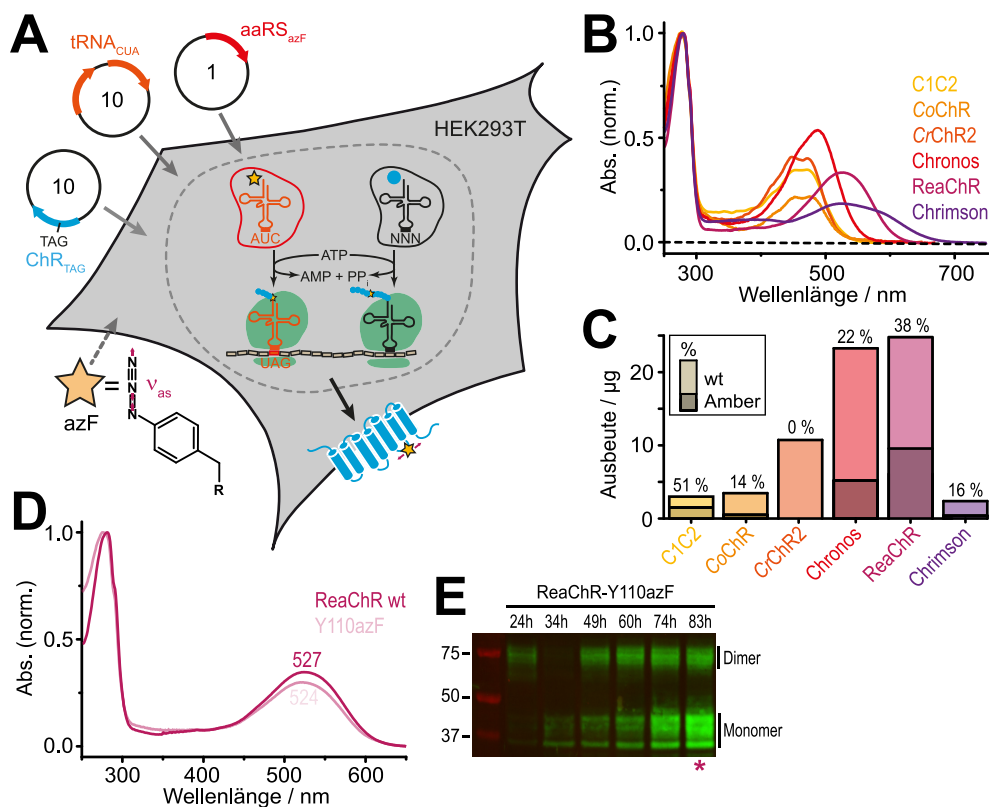


Abbildung 48: Stopp-Codon-Suppression in ChRs. **A)** Vereinfachtes Schema der Stopp-Codon-Suppression (SCS) in HEK293T-Zellen. Durch die Kotretransfektion eines orthogonalen Paares eines tRNA-Hybrids mit modifiziertem Anticodon (tRNA_{CUA}) und einer mutierten Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS_{azF}) wird die nichtkanonische, IR-aktive Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) ortsspezifisch als Folge eines Amber-Stopp-Codons (TAG) in der mRNA des Zielgens in das Protein inkorporiert. Mengenverhältnis der drei Plasmide für die Lipofektion ist skizziert. **B)** UV-vis-Spektren von sechs verschiedenen ChRs in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM normiert auf Absorption bei 280 nm. **C)** Vergleich der Proteinausbeuten (µg pro Kulturschale mit 55 cm² Wachstumsfläche) von ChRs (*klar*) und deren C1C2-Y109azF-Homologe (C1C2-Y50azF, CrChR2-Y70azF, Chronos-Y87azF, ReaChR-Y110azF & Chrimson-Y112azF, *schattiert*). Berechnung der Ausbeute über die Chromophorabsorption mit $\epsilon_{\text{Chrom}} = 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. $\epsilon_{\text{Chrom}} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für ReaChR (cf. Abbildung 29). Suppressionseffizienz (Ausbeute azF-Mutante / WT, in %) wurde berechnet. CrChR2-Y70azF zeigte keine Chromophorabsorption. **D)** Normierte UV-vis-Spektren von ReaChR und Y110azF in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. **E)** Zeitlicher Verlauf der Expression von ReaChR-Y110azF in HEK293T-Zellen (30 µg Zelllysate/Tasche) evaluiert via Western Blot (Antikörper: 1) Hybridoma 1D4, 2) anti-Maus IRDye 800CW) nach semi-denaturierender SDS-PAGE. Maximale Expression 83 h post-transfektion (Sternchen). Molekularmarker in kDa. M_w(ReaChR) = 39.6 kDa.

Über die Chromophorabsorption der rekombinanten Photorezeptoren (Abbildung 48B) wurden die Ausbeuten berechnet und die Suppressionseffizienz abgeschätzt. Während C1C2

(WT: $m = 2.99 \mu\text{g}$; Y109azF: $m = 1.53 \mu\text{g}$; bezogen auf 55 cm^2 Wachstumsfläche) zwar die höchste Suppressionseffizienz (Ausbeute azF-Mutant / WT = 51 %) aller getesteten Varianten aufwies, waren die absoluten Proteinmengen dennoch ziemlich gering. Vergleichbar niedrige Expressionsniveaus der WT-Proteine zeigten auch CoChR ($m = 3.46 \mu\text{g}$) und Chrimson ($m = 2.38 \mu\text{g}$), allerdings mit deutlich schlechterer Suppressionseffizienz von 14 bzw. 16 %. In den Expressionstests konnte die dritthöchste Ausbeute für CrChR2 ($m = 10.73 \mu\text{g}$) erzielt werden, die korrespondierende Y70azF-Mutante zeigte aber keine Chromophorabsorption (Suppressionseffizienz = 0 %). Für Chronos und ReaChR konnten die höchsten Proteinmengen von WT ($m = 23.26$ bzw. $25.11 \mu\text{g}$) und azF-Mutante ($m = 5.20 \mu\text{g}$ bzw. $9.44 \mu\text{g}$) generiert werden. Aufgrund der besten Suppressionseffizienz und bereits zahlreicher gesammelter Erkenntnisse wurde sich für ReaChR als Modellsystem für die Inkorporation des IR-Sensors entschieden. Grundsätzlich ist bei der Bewertung der Expressionsniveaus von Azidomutanten allerdings immer zu berücksichtigen, dass die exprimierenden Zellen simultan mit drei Vektoren, 1) ChR_{TAG}, 2) tRNA_{CUA} und 3) aaRS_{azF}, kotransfiziert sein müssen, wohingegen es bei der WT-Expression nur des einen ChR-Plasmids bedarf, um funktionelles Protein zu generieren.

Abbildung 48D zeigt das UV-vis-Spektrum von ReaChR-Y110azF, welches bis auf eine leicht reduzierte Chromophorabsorption und eine Blauverschiebung von ca. 3 nm dem WT-Spektrum ähnelt. Um bestmögliche Expressionsbedingungen zu gewährleisten, wurde die Expressionsdauer mittels Western Blot evaluiert. Im Gegensatz zu C1C2, welches den höchsten Expressionsgrad ca. 36 h post-transfektionell zeigte (cf. Abbildung 24B), wurde innerhalb der Testreihe die größte Proteinproduktion für ReaChR-Y110azF 83 h nach Transfektion detektiert. Infolgedessen wurden die HEK293T-Zellen nach der Transfektion für weitere 72 bis 96 h kultiviert.

3.4.2 Bio-orthogonale Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe

Als erste Evidenz für den erfolgreichen Einbau und die Konservierung der Funktionalität von azF in ReaChR wurden bio-orthogonale Kopplungen zwischen dem eingeführten azF und einem Alexa-Fluorophor durchgeführt. Für die Substitution wurden Tyrosin 112 und Tryptophan 115 innerhalb des ICL1 ausgewählt (cf. Abbildung 52A), da angenommen wurde, dass sie aufgrund ihrer vermuteten Exposition zur Proteinoberfläche eine gute Kopplungseffizienz liefern würden. Nach der Solubilisierung der beiden azF-Mutanten, wurden sie mit dem immobilisierten 1D4-Antikörper inkubiert und so an die feste Phase gebunden (Immunopräzipitation) (Abbildung 49A). Es folgte die bio-orthogonale Kopplung der Azidogruppe an einen rot-absorbierenden Cyaninfarbstoff (Alexa647, $\lambda_{\text{max}} = 654 \text{ nm}$) mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition. Der Reaktionspartner des azF war ein gespanntes Dibenzocyclooctin (DIBO), welches die Bildung des fünfgliedrigen 1,2,3-Triazols auch ohne Kupferkatalyse bei 4 °C ermöglichte (engl. *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*, SPAAC). Das ungebundene DIBO-Alexa647-Konjugat wurde mittels zahlreicher Waschschr

Sepharsematrix entfernt, bevor die markierten ReaChR-Mutanten vom Säulenmaterial eluiert und spektroskopisch untersucht wurden.

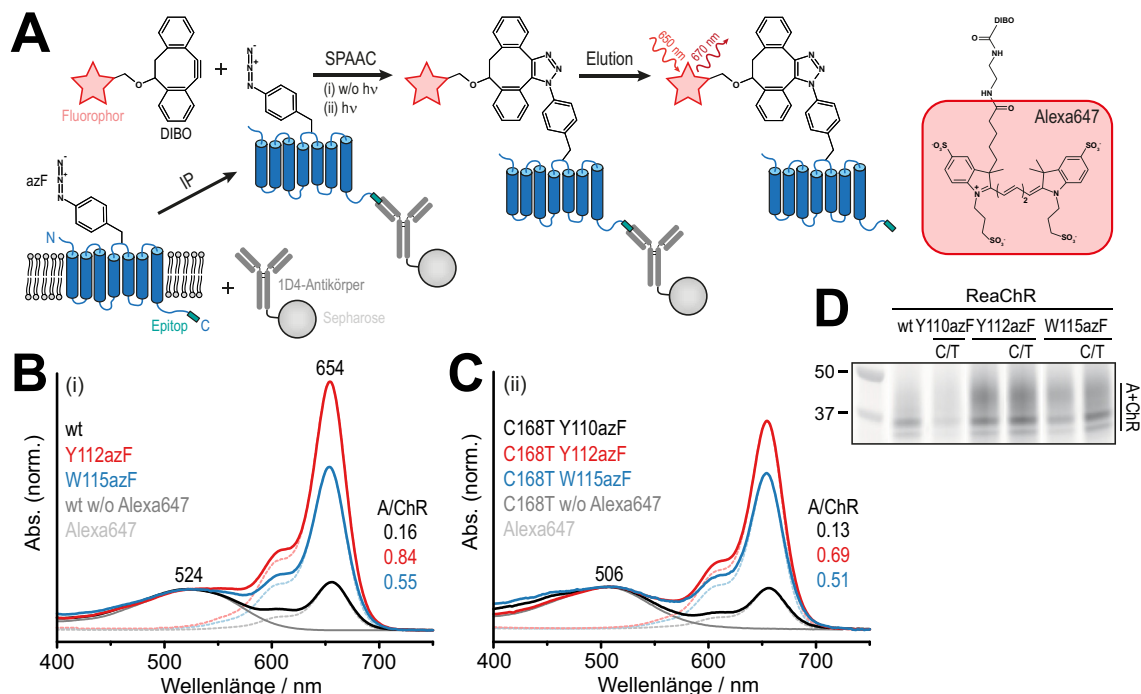


Abbildung 49: Bio-orthogonale Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe. A) Nach Immunopräzipitation (IP, Bindung des C-terminalen Affinitätspeptids (*türkis*) an den immobilisierten 1D4-Antikörper (*grau*)) der solubilisierten Azidomutante an eine Sepharosematrix, erfolgt eine 1,3-dipolare Cycloaddition (SPAAC) der Azidogruppe mit einem Dibenzocyclooctin (DIBO), welches über einen Diaminlinker kovalent an einen Cyaninfarbstoff (Alexa 647) gebunden ist. Die Kopplung wurde bei 4 °C über Nacht (12 - 16 h) in der Ab- (i) bzw. Anwesenheit (ii) von grünem Licht (505 nm, LED) durchgeführt. Nach vollständiger Entfernung von freiem Fluorophor (mehrere Waschschrte) wurde der markierte Photorezeptor von der stationären Phase mit einem Überschuss an freiem 1D4-Peptid eluiert. Normierte UV-vis-Spektren von ReaChR, Y112azF und W115azF (**B**) sowie C168T-Y110azF, C168T-Y112azF und C168T-W115azF (**C**) nach Hybridisierung an den Alexa-Fluorophor. Spektren von WT (**B**) und C168T (**C**) sowie ungebundenem Alexa647 sind zur Anschauung unterlegt. Kopplungseffizienz (A/ChR) wurde in Analogie zu Tian *et al.* (2013) berechnet: $(A_{\text{Alexa}}/\epsilon_{\text{Alexa}})/(A_{\text{Chrom}}/\epsilon_{\text{Chrom}})$ mit $\epsilon_{\text{Alexa}} = 239.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{Chrom}} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (*cf.* Abbildung 29). **D)** Fluoreszenzscan eines SDS-Gels nach PAGE von jeweils 100 ng markiertem Protein. C/T, C168T; Molekularmarker in kDa. $M_w = 39.6 \text{ kDa}$ (ReaChR); $\sim 1.5 \text{ kDa}$ (Alexa647-DIBO).

Für die Quantifizierung der Kopplungseffizienz wurde das Verhältnis der absoluten Fluorophor- und Chromophorabsorption (A/ChR) ermittelt und untereinander verglichen. Während für ReaChR nur eine geringe Markierung von A/ChR = 0.16 beobachtet wurde, lagen die erzielten Verhältnisse für Y112azF bzw. W115azF bei 0.84 und 0.55 (Abbildung 49B). Warum keine quantitative Kopplung erzielt wurde, lässt sich ohne Kenntnis der Struktur des ICL1 (nicht aufgelöst in der C1C2-Kristallstruktur) nur spekulieren. Zumindest wurde berichtet, dass die [2+3]-Cycloaddition in wasserexponierten Proteinsegmenten aufgrund des hydrophoben Charakters des DIBO-Grundkörpers eine bis zu 1.000fach geringere Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber transmembranen Regionen innehat (Tian *et al.* 2015). Trotz der langen Reaktionszeit von 12 - 16 h könnte die Reaktion evtl. noch nicht vollständig abgelaufen sein.

Die relativ hohe Hintergrundmarkierung des Wildtyps von 16 % könnte einer ungewollten Additionsreaktion von exponierten Thiolen von Cysteinresten mit dem Cyclooctin geschuldet sein (van Geel *et al.* 2012). ReaChR hat insgesamt neun Cysteine, wobei wahrscheinlich die drei im extrazellulären N-Terminus (C67, C74 & C76), wenn nicht wie in C1C2 als Disulfid vorliegend, sowie C119 (ICL1) und C209 (ECL2) zugänglich sein müssten (*cf.* Abbildung 47A). Freie Thiolgruppen könnten wiederum direkt mit dem Azid eine Redoxreaktion eingehen und unter Abspaltung von molekularem Stickstoff *p*-Amino-L-phenylalanin bilden. Eine Reduktion des aliphatischen Homoazidoalanins zum primären Amin (2,4-Diaminobuttersäure) wurde bei cytoplasmatischer Expression, d.h. unter reduzierenden Bedingungen, einer löslichen Dihydrofolat-Reduktase berichtet (Kiick *et al.* 2002). Beide Reaktionen würden das Ausmaß der Markierung reduzieren. Nichtsdestotrotz ließe sich auch nach Subtraktion der unspezifischen Proteinmarkierung eine Effizienz von knapp 70 % für Y112azF ausmachen. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass die N₃-Funktionalität größtenteils innerhalb des exprimierten Proteins intakt vorliegt und es zu keinen bzw. nur zu einem geringen Teil zu ungewollten Nebenreaktionen kommt.

Mithilfe der bio-orthogonalen Kopplung wurde im Folgenden versucht die leitende Kanalkonfiguration von ReaChR zu stabilisieren. Dazu wurde sich als Proteinrückgrat der DC-Paar-Mutante C168T bedient, welche im Vergleich zum WT einen zumindest etwas langsameren Photozyklus aufweist (*cf.* Abbildung 36). Die 1,3-dipolare Cycloaddition wurde im Gegensatz zu den ersten Kopplungsexperimenten unter kontinuierlicher Belichtung (505 nm, LED) durchgeführt, um den offenen Zustand zu akkumulieren. Neben zwei Aminosäuren in ICL1 (Y112 & W115) wurde auch Tyrosin 110 untersucht, dessen Homolog in der C1C2-Kristallstruktur in Richtung der Kanalpore orientiert ist (Kato *et al.* 2012). Für alle getesteten Doppelmutanten wurde eine geringere Kopplungseffizienz wie für die einfachen Azidomutanten bilanziert. Das A/ChR-Verhältnis der C168T-Y110azF-Mutante lag dabei in der gleichen Größenordnung wie die Hintergrundmarkierung des WT und impliziert das Ausbleiben jeglicher Markierung. Höchstwahrscheinlich kann das sperrige DIBO-Molekül nicht den intrazellulären Eingang der geöffneten Kanalpore passieren, vermutlich aufgrund eines kleineren Innendurchmessers des Kanals.

Die geringere Kopplungseffizienz der Y112azF- und W115azF-Doppelmutanten könnte den lichtinduzierten Helixbewegungen von H2, H6 und H7 (Krause *et al.* 2013; Sattig *et al.* 2013; Takemoto *et al.* 2015; Müller *et al.* 2015; Kuhne *et al.* 2015; Volz *et al.* 2016) geschuldet sein, infolgedessen die Azidomarker im ICL1 (zwischen H1 und H2) in eine ungünstige, evtl. verborgene Position manövriert werden, welche für das DIBO-Alexa647-Konjugat weniger gut zugänglich sein könnte.

Die isolierten Einfach- und Doppelmutanten wurden ebenfalls auf die Fluoreszenz des gekoppelten Fluorophors hin untersucht. Nach semi-denaturierender SDS-PAGE wurde der kovalent gebundene Cyaninfarbstoff der aufgetrennten Proben mit einem Laser ($\lambda_{\text{Exz}} = 633 \text{ nm}$) angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 670 nm detektiert. Die beobachteten Banden erscheinen wie für den WT (*cf.* Abbildung 27C) aufgrund der nicht quantitativen und auch heterogenen Glykosylierung in HEK293-Zellen in einem ausgedehnten Größenbereich

(Abbildung 49D). Bis auf eine höhere Kopplung von C168T-W115azF im Vergleich zu W115azF, decken sich die Ergebnisse mit denen der Absorptionsspektren. Ein Fluoreszenzsignal von ReaChR wird aufgrund der kurzen Lebenszeit des angeregten Zustands (~100 - 450 fs) in ChRs (Verhoeven *et al.* 2010; Stensitzki *et al.* 2015; Schnedermann *et al.* 2016; Hontani, Marazzi *et al.* 2017) nicht erwartet. Des Weiteren wäre zum einen der Retinal-Cofaktor nach der SDS-PAGE höchstwahrscheinlich dissoziiert und zum anderen würde die Anregungswellenlänge zu weit im langwelligen Spektralbereich liegen.

3.4.3 Evaluierung der Orthogonalität des tRNA/aaRS-Paars

In diesem Abschnitt wurde die Suppressionseffizienz des orthogonalen Paares mittels funktioneller und bildgebender Methoden in HEK293T-Zellen evaluiert und die Y110azF-Mutante von ReaChR charakterisiert. Als Referenz diente ReaChR-mCerulean3, welches in Anwesenheit des tRNA_{CUA}/aaRS_{azF}-Paares sowie der unnatürlichen Aminosäure azF im Medium exprimiert wurde. In Analogie zu publizierten elektrophysiologischen Daten zum WT (Kaufmann *et al.* 2017) ist ReaChR einwärtsrektifizierend und zeigt größere Einwärtsströme unter negativen Haltespannungen als Auswärtsströme unter positiven Haltespannungen des gleichen Werts (Abbildung 50A). Wie in anderen ChRs inaktiviert der transiente Strom in ReaChR unter Dauerlicht (530 nm, 500 ms) zu einem stationären Niveau mit geringerer Amplitude. Auf Basis der konfokalen Mikroskopiebilder lässt sich eine gute Membranständigkeit des Fusionskonstrukts bestätigen.

Unter den gleichen Bedingungen, allerdings ohne die Supplementation von azF im Nährmedium, wurde ReaChR-Y110azF-mCerulean3 exprimiert. Die Azidomutante zeigte nur marginale Kanalströme (Abbildung 50B). Das Resultat impliziert, dass in Abwesenheit der nichtkanonischen Aminosäure das Amber-Stopp-Codon nicht „überlesen“ werden kann und es zu keinem bzw. nur sehr basalem Einbau eines anderen Substrats wie z.B. Tyrosin kommt. In den überwiegenden Fällen wird die Translation jedoch nach 109 Aminosäuren terminiert und ein verkürztes Polypeptid gebildet, welches nicht imstande ist, den lichtgetriebenen Ionentransport zu katalysieren. Dieser Befund korreliert mit einer geringen Lokalisation des Fusionskonstrukts in der Zellmembran. Die residuale Fluoreszenz könnte durch eine erneute Translationsinitiation an einem späteren, d.h. mehr in Richtung des C-Terminus orientierten Methionins erklärt werden. Da die Fluoreszenz primär im hydrophilen Cytosol zu finden ist, scheint das translatierte Produkt zum größten Teil aus dem löslichen fluoreszierenden YFP-Derivat zu bestehen.

Bei Zugabe von azF sind für ReaChR-Y110azF-mCerulean3 WT-ähnliche Ströme zu verzeichnen, wenn auch mit geringerer Amplitude (~33 %), und das Fusionskonstrukt ist primär in der Zellmembran verortet (Abbildung 50C, D). Offensichtlich vermag die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure die vorzeitige Translationstermination am TAG-Codon zu supprimieren und das Volllängenprotein wird exprimiert. Die reduzierten Kanalströme lassen sich grundsätzlich mit einer geringeren Volllängenexpression der Azidomutante im Vergleich zum WT erklären. Da das Expressionsmaximum im Vergleich zum WT-Protein erst bei 72 - 96 h erreicht wird (*cf.* Abbildung 48E), könnte eine längere Kultivierung der zu

vermessenden HEK293T-Zellen die Stromamplituden entsprechend vergrößern. Dennoch liegt die Suppressionseffizienz in den elektrophysiologischen Messungen von $\sim 33\%$ in Übereinstimmung zu der von rekombinantem Protein (38%) (cf. Abbildung 48C). Auch das Aktionsspektrum (10 ms Belichtung) von Y110azF deckt sich mit dem des WT (Abbildung 50E). Lediglich der Kanalschluss ist im Vergleich zum WT um 1.8fach beschleunigt (WT: $\tau_{\text{off}} = 255 \pm 40$ ms; Y110azF: $\tau_{\text{off}} = 142 \pm 54$ ms) (Abbildung 50F).

Anhand der elektrophysiologischen Resultate lässt sich eine hohe Orthogonalität des tRNA_{CUA}/aaRS_{azF}-Paars bilanzieren, welches nur in Anwesenheit des artifiziellen Substrats entsprechendes markiertes Volllängenprotein generiert. Trotz der leicht veränderten Kinetiken ist die Kanalfunktion in Y110azF konserviert und die Eigenschaften entsprechen weitgehend denen des WT.

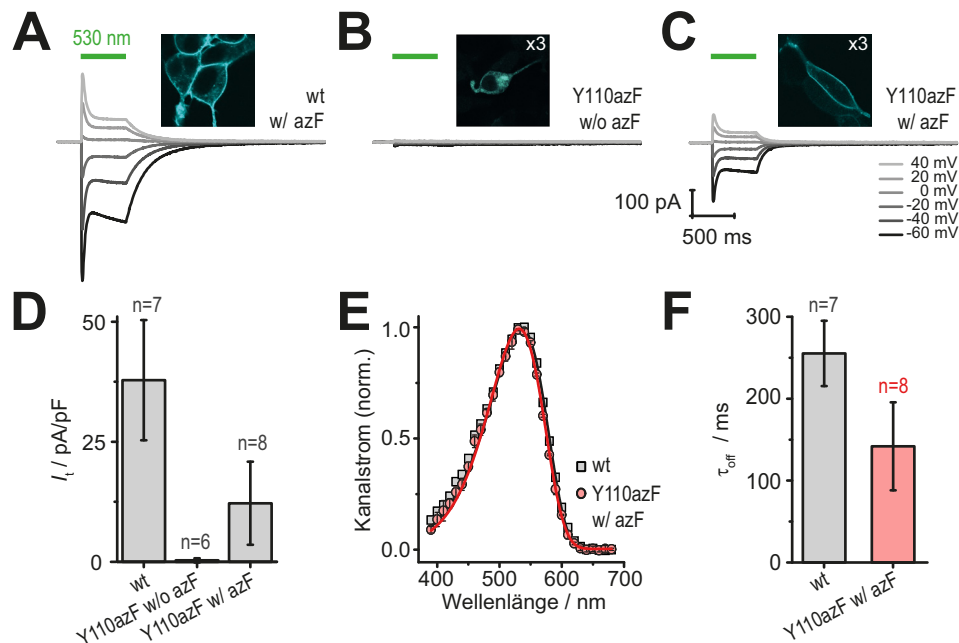


Abbildung 50: Elektrophysiologische Evaluierung des orthogonalen Paares und Charakterisierung von ReaChR-Y110azF. Elektrophysiologische Messungen in der Ganzzell-Konfiguration und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie an HEK293T-Zellen, welche entweder ReaChR-mCerulean3 in der Anwesenheit von *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) (A) oder ReaChR-Y110azF-mCerulean3 mit (C) bzw. ohne azF im Medium (B) exprimieren. Alle Zellen wurden kotransfiziert mit den für tRNA_{CUA} und aaRS_{azF} kodierenden Vektoren. Für die konfokalen Bilder wurde der Fluorophor (mCerulean3) entweder mit 2 % (A, Einschub) oder 6 % Laserpower (B & C, Einschübe) bei 440 nm angeregt. **D)** Transiente Photoströme (I_t) wurden als Balkendiagramm dargestellt. n, Anzahl der Messungen. **E)** Aktionsspektren (10 ms Belichtung) vom WT (graue Rechtecke) und Y110azF in Anwesenheit von azF (rote Punkte). Datenpunkte wurden mit Weibull-Funktionen gefittet. **F)** Kinetik des Kanalschlusses (apparente τ_{off} , biexponentieller Fit) von WT (grau) und Y110azF (rot) nach Belichtung (530 nm, 500 ms). Transfektion aller HEK293T-Zellen sowie konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde von Benjamin Krause und elektrophysiologische Messungen von Johannes Vierock (AG Hegemann, HU Berlin) durchgeführt.

3.4.4 FTIR-Spektroskopie an freiem azF und ReaChR-Y110azF

Um die spätere Interpretation von FTIR-Banden der unnatürlichen Aminosäure innerhalb der komplexen Proteinumgebung zu erleichtern, wurde als erstes das freie azF untersucht. Freies azF absorbiert in Isopropanol bei $\nu_{\max} = 2115.5 \text{ cm}^{-1}$ und erfährt beim Wechsel zu Wasser eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 13.1 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen ($\nu_{\max} = 2128.6 \text{ cm}^{-1}$) (Abbildung 51A). Dabei nimmt $\nu_{\max}(\text{azF})$ mit steigendem Volumenanteil von Wasser, d.h. zunehmender Hydratisierung, exponentiell zu (Abbildung 51A, Einschub). Die hypsochrome Verschiebung von azF korreliert mit einer Abnahme der spektralen Feinstruktur.

Während das Spektrum in Isopropanol nur mit drei Lorentz-Funktionen ($\nu_{\max} = 2137, 2117 \text{ \& } 2101 \text{ cm}^{-1}$) zufriedenstellend angenähert werden kann, genügen in Wasser zwei Komponenten ($\nu_{\max} = 2131 \text{ \& } 2113 \text{ cm}^{-1}$). Die intensivste der beiden ($\nu_{\max} = 2131 \text{ cm}^{-1}$) bzw. drei Komponenten ($\nu_{\max} = 2117 \text{ cm}^{-1}$) wurde der eigentlichen asymmetrischen Streckschwingung der N_3 -Gruppe ($\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$) zugeordnet (Bazewicz *et al.* 2013), wohingegen die übrigen, meist niederfrequenten Banden von anharmonischer Kopplung wie z.B. „versehentlicher“ (engl. *accidental*) Fermi-Resonanz (Dyall & Kemp 1967; Nydegger *et al.* 2010; Lipkin *et al.* 2011) bzw. Überlagerungen von symmetrischen und asymmetrischen Valenzschwingungen herrühren (Silverman *et al.* 2007). Die Halbwertsbreite beider Spektren ist jedoch nahezu identisch ($\text{FWHM}_{\text{H}_2\text{O}} = 34.9 \text{ cm}^{-1}$; $\text{FWHM}_{\text{Isopro}} = 34.5 \text{ cm}^{-1}$).

Da im weiteren Verlauf der Arbeit lichtinduzierte Änderungen auf Basis von Differenzspektren evaluiert werden sollen, wurden vermeintliche Hydratisierungsänderungen „simuliert“. Die azF-Spektren in Wasser und in drei Mischverhältnissen aus Wasser und Isopropanol wurden mit dem reinen Isopropanolspektrum subtrahiert (Abbildung 51B). Die berechneten Differenzspektren beschreiben also den Übergang von einer wenig polaren, eher hydrophoben Umgebung in eine moderat bis stark polare wässrige Phase. Da nur der Extinktionskoeffizient von azF (ϵ_{azF}) in einer 50:50-Mischung aus Wasser und Glycerol bekannt ist ($\epsilon = 680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Suydam & Boxer 2003), wurden zwei Szenarien konstruiert. Im Ersteren wurde der gleiche Extinktionskoeffizient von azF in Wasser und in Isopropanol (Abbildung 51B, *links*) angenommen. Im Gegensatz dazu sah der zweite Fall einen 50 % reduzierten ϵ_{azF} in dem organischen Lösungsmittel vor (Abbildung 51C, *links*).

Das Spektrum des ersten Falls zeigt ein eher „typisches“ Differenzsignal bestehend aus einer positiven und zwei negativen Banden. Die Amplitude des Signals korreliert mit der Zunahme des Wasseranteils in den Mischfraktionen und kann somit als Indiz für Hydratisierungsänderungen angesehen werden. Infolgedessen sind bei geringen Solvatisierungsunterschieden auch nur kleine Banden zu erwarten, da die zugrunde liegenden Spektren weitestgehend überlagern. Dies ist besonders für wenig polare Umgebungen der Fall, in denen die Absorptionsmaxima nur einige Wellenzahlen voneinander separiert sind. Während sich die spektrale Lage der negativen Differenzbanden (Isopropanolspektrum) nicht ändert, verschieben sich die ν_{\max} -Werte der positiven Banden mit zunehmender Hydratisierung (% H_2O). Es lässt sich eine lineare Abhängigkeit konstatieren (Abbildung 51B, *rechts*). Auf dieser

Basis dient neben der Amplitude des Differenzsignals auch die spektrale Lage dieser positiven, fortan als Markerbande bezeichneten Bande als Maß für Hydratisierungsänderungen.

Eine ähnliche lineare Korrelation konnte auch im zweiten Szenario bilanziert werden. Jedoch dominieren aufgrund des reduzierten ϵ_{azF} in Isopropanol die positiven Banden der Wasserspektren. Die detektierten Hydratisierungsänderungen äußern sich in einer Verschiebung der Markerbande von $2122 \pm 1(+)$ cm^{-1} (wenig hydratisiert, % H_2O = 25 %) nach $2131(+)$ cm^{-1} (vollständig hydratisiert, % H_2O = 100 %), sind also gegenüber dem ersten Fall 2 - 3 cm^{-1} in den niederfrequenten Bereich verschoben. In Analogie zu β -Azidoalanin, welches einen um 22 % bzw. 40 % reduzierten Extinktionskoeffizient in DMSO ($\epsilon_r = 46.7$) bzw. in THF ($\epsilon_r = 7.6$) aufweist, scheint ein deutlich geringerer ϵ_{azF} in Isopropanol ($\epsilon_r = 19.9$) wahrscheinlich. Im Folgenden wird sich daher hauptsächlich der letzten Korrelation bedient.

Um zum einen den erfolgreichen Einbau von azF in ReaChR zu bestätigen, und zum anderen den Hydratisierungsgrad im Inneren Tor im Dunkelzustand abschätzen zu können, wurden FTIR-Dunkelspektren von WT und Y110azF ohne Verwendung eines optischen Filters zwischen 4000 und 900 cm^{-1} aufgenommen. Neben den bereits charakterisierten Proteinschwingungen $\nu < 1800$ cm^{-1} (*cf.* Abbildung 43A) sind hauptsächlich OH-Valenzschwingungen von Wasser zwischen 3700 und 2800 cm^{-1} und symmetrische NH-Oszillationen des Proteinrückgrats (Amid A) zwischen 3500 und 3200 cm^{-1} zu beobachten. Bemerkenswerterweise zeichnet sich für die Y110azF eine Bande zwischen 2200 und 2000 cm^{-1} ab, welche im WT nicht beobachtet wurde und auf den erfolgreichen Einbau des artifiziellen Analogons hinweist (Abbildung 51D, *links*). Das berechnete Differenzspektrum (Y110azF minus WT) offenbart ein Maximum bei 2115 cm^{-1} mit einem Seitenmaximum bei ca. 2073 cm^{-1} und einer Schulter bei 2167 cm^{-1} (Abbildung 51D, *rechts*). Die spektrale Lage des Maximums entspricht der von freiem azF in Isopropanol ($\nu_{\text{max}} = 2115.5$ cm^{-1}) und suggeriert eine relativ hydrophobe und wenig polare Umgebung von Y110azF im unbelichteten Zustand. Im Vergleich zur freien nichtkanonischen Aminosäure weist die Bande des inkorporierten azF eine ca. 3.3fach größere Halbwertsbreite ($\text{FWHM}_{\text{Y110azF}} = 113$ cm^{-1}) auf, die Feinstruktur ist jedoch konserviert. So lässt sich das Azidosignal von ReaChR-Y110azF ebenfalls mit drei Lorentz-Funktionen ($\nu_{\text{max}} = 2157, 2118$ & 2069 cm^{-1}) annähern.

Eine Quantifizierung der Suppressionseffizienz bzw. der funktionellen Konservierung der Azidogruppe über das Verhältnis von $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ ($\epsilon = 250 - 680$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Suydam & Boxer 2003; Oh *et al.* 2008; Nydegger *et al.* 2010; Bloem *et al.* 2012; Ma *et al.* 2015) zu einer bekannten Proteinschwingung z.B. Amid I ($\epsilon = 720$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Oh *et al.* 2008) wäre zwar theoretisch möglich, jedoch stört auch hier die intensive Wasserabsorption bei ca. 1630 cm^{-1} . Die fälschliche Inkorporation von Tyrosin durch die modifizierte Tyrosyl-Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS_{azF}) anstelle von azF und/oder Abbauprozesse z.B. Reduktion zum *p*-Amino-L-phenylalanin würden zu einer Verkleinerung der Amplitude des azF-Signals führen, das Spektrum aber nicht qualitativ verändern.

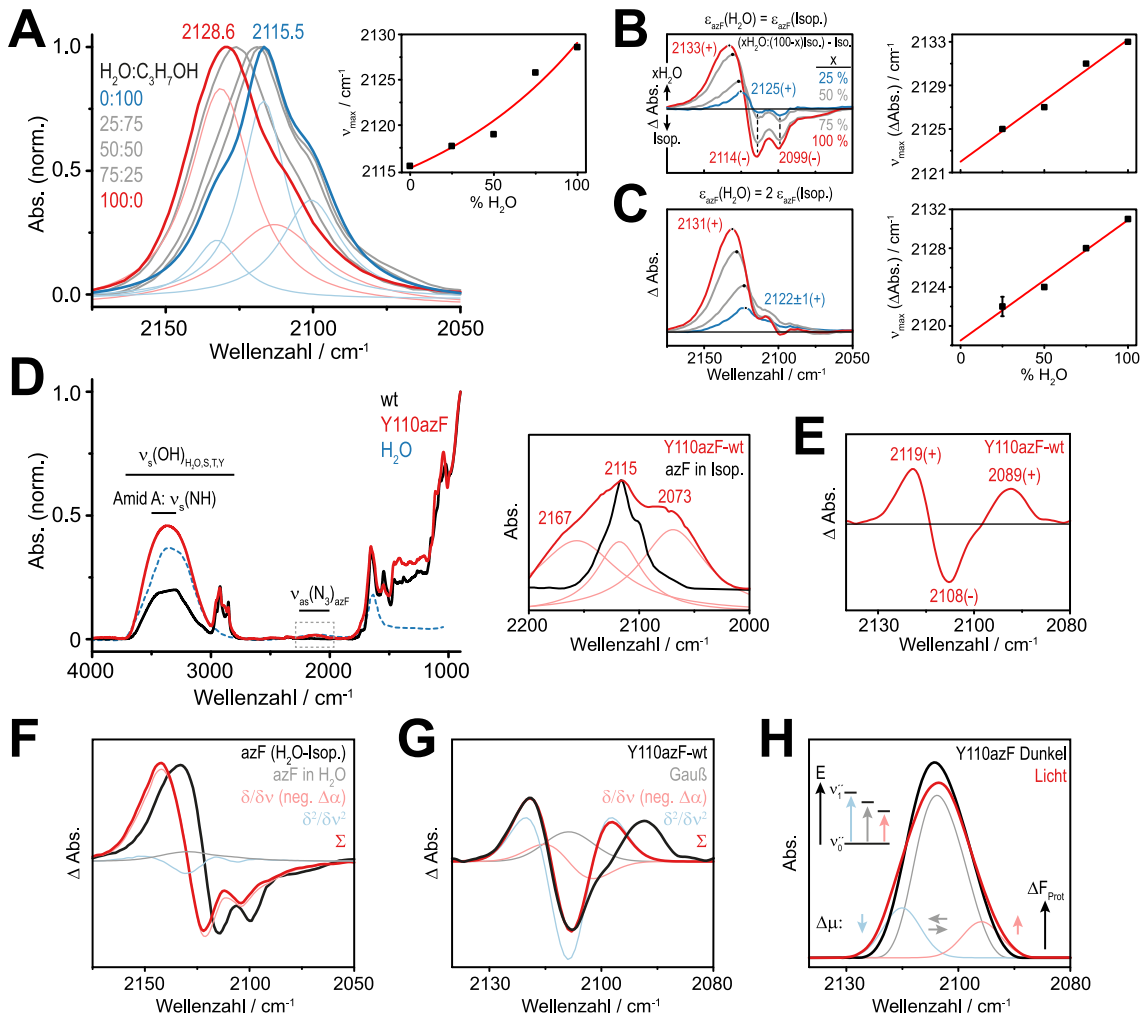


Abbildung 51: FTIR-Spektroskopie an *p*-Azido-L-phenylalanin und ReaChR-Y110azF. **A)** FTIR-Spektren und deren Absorptionsmaxima (ν_{\max}) von azF in Mischungen aus Wasser und Isopropanol (*links*). Daten sind entnommen aus Ye *et al.* (2009). Die Spektren in Wasser und Isopropanol wurden mit zwei bzw. drei Lorentz-Funktionen gefittet (*schwache farbige Linien*). Korrelation des wässrigen Anteils mit den korrespondierenden ν_{\max} -Werten (*rechts*). Berechnete Differenzspektren ($x\text{H}_2\text{O}$ minus Isopropanol, $x = 25 - 100\%$) unter Annahme des gleichen Extinktionskoeffizienten von azF (ϵ_{azF}) in Wasser und in Isopropanol (**B**, *links*) bzw. eines 50 % reduzierten ϵ_{azF} in Isopropanol (**C**, *links*). Zusammenhang zwischen Hydratisierungsgrad (% H_2O) und ν_{\max} der Differenzspektren (**B** & **C**, *rechts*). **D)** Normierte FTIR-Spektren des Dunkelzustands von ReaChR (*schwarz*) und Y110azF (*rot*) nach Basislinienkorrektur (*links*). Einige spektrale Bereiche wurden konkreten Schwingungen zugeordnet. Wasserspektrum (*blau gestrichelt*) entnommen aus Bertie *et al.* (1989) wurde an die Wasserbande mit ν_{\max} bei ca. 3300 cm^{-1} von Y110azF angepasst. Differenzspektrum (Y110azF minus WT) zwischen 2200 und 2000 cm^{-1} wurde mit drei Lorentz-Funktionen approximiert (*rechts*). azF-Spektrum in Isopropanol aus **A**. **E)** Photostationäres FTIR-Doppeldifferenzspektrum nach LED-Anregung ($\sim 530\text{ nm}$) von ReaChR-Y110azF. **F)** Modellierung des berechneten Differenzspektrums (Wasser minus Isopropanol, *schwarz*) von freiem azF aus **B** mit der Summe (*dunkelrot*) aus der gewichteten nullten (*grün*), ersten (*hellrot*) und zweiten Ableitung (*blau*) des azF-Spektrums in Wasser aus **A**. **G)** Modellierung des Doppeldifferenzspektrums (Y110azF minus WT, *schwarz*) aus **E** mit der Summe (*dunkelrot*) aus der gewichteten nullten (*grün*), ersten (*hellrot*) und zweiten Ableitung (*blau*) einer Gauß-Glockenkurve ($\nu_0 = 2108.8\text{ cm}^{-1}$, FWHM = 15.4 cm^{-1}). **H)** Rekonstruktion des Dunkelspektrums von ReaChR-Y110azF (*schwarz*) durch doppelte Integration des Doppeldifferenzspektrums aus **E**. Das Lichtspektrum (Dunkelspektrum minus skaliertes Doppeldifferenzspektrum) und dessen Zusammensetzung sind skizziert. Die einzelnen spektralen Komponenten wurden modelliert. Der Einfluss der Orientierung der Vektoren der Dipolmoments-Änderungen ($\Delta\mu$) auf die energetische Lage des ersten angeregten vibronischen Zustands (ν_0) ist illustriert (*bunte Pfeile*). Die Richtung der lichtinduzierten Änderungen des elektrischen Felds des Proteins (ΔF_{Prot}) ist dargestellt (*schwarzer Pfeil*). Probenpräparation wurde von Benjamin Krause und schwingungsspektroskopische Messungen von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt.

Zum Abschluss des Kapitels wurde ein gemessenes FTIR-Differenzspektrum (Licht minus Dunkel, photostationärer Zustand) von ReaChR-Y110azF mit den berechneten Differenzspektren der Polaritätsstudie verglichen. Ziel war es die Entstehung des Bandenmusters besser zu verstehen. Eine detaillierte Analyse der lichtinduzierten Änderungen in Bezug auf den Reaktionsmechanismus erfolgt im nächsten Kapitel (*cf.* Kapitel 3.4.5). Im Vergleich zu freiem azF ist das Signal der proteingebundenen Aminosäure komplexer. Es besteht aus zwei positiven und einer negativen Bande (Abbildung 51E). In Analogie zu den Dunkelspektren könnte das hochfrequente Paar (2119(+) & 2108(-) cm^{-1}) der eigentlichen asymmetrischen N_3 -Streckschwingung zugeordnet werden. Die zweite positive Bande bei 2089 cm^{-1} könnte als Resultat von anharmonischer Kopplung ($\nu_{\text{Fermi}}(\text{N}_3)$) gewertet werden. Das Amplitudenverhältnis von $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ zu $\nu_{\text{Fermi}}(\text{N}_3)$ lässt sich mit dem individuellen Anteil der spektralen Komponenten des Dunkelspektrums vernünftig in Einklang bringen.

Alternativ ließe sich eine konformationelle Heterogenität von Seitenkettenrotameren von azF sowie die Koexistenz von verschiedenen Intermediaten im detektierten Zustand mit unterschiedlichen Labelorientierungen als Ursache für die Komplexität des Differenzspektrums anführen. Dieses Argument lässt sich gut mit bereits vorgestellten Analysen des photostationären Zustands vereinbaren, welche eine Koexistenz von mehreren Intermediaten nahegelegt hatten (*cf.* Abbildung 44).

Eine Frage, welche es zu beantworten gilt, ist, wie die Unterschiede in den Differenzspektren zwischen freiem und inkorporiertem azF zustande kommen. Erklärungsansätze liefert die Stark-Spektroskopie. Es ist augenscheinlich, dass das Differenzspektrum (Licht minus Dunkel) von ReaChR-Y110azF eine große Ähnlichkeit zu Stark-Spektren aufweist. Unter der Annahme, dass trotz der Abwesenheit einer angelegten Spannung, die lichtinduzierten Konformationsänderungen auch die Elektrostatik innerhalb des Proteins (F_{Pro}) verändern könnte, wäre eine Auswertung wie sie in der Stark-Spektroskopie üblich ist (*cf.* Kapitel 2.8.4) denkbar. Als erstes wurde die Auswertroutine auf das berechnete Differenzspektrum (Wasser minus Isopropanol) von freiem azF aus Abbildung 51B angewendet. Als Basisfunktion diente das FTIR-Spektrum von azF in Wasser. Obwohl die Summe der gewichteten Ableitungen dem eigentlichen Differenzspektrum sehr nahekommt, ist sie um 8 - 9 cm^{-1} in den hochfrequenten Spektralbereich verschoben (Abbildung 51F). Auffällig ist der hohe Anteil der ersten Ableitung am Gesamtspektrum, was große Änderungen der Polarisierbarkeit ($\Delta\alpha$) der Azidogruppe suggeriert. Dieser Befund ist nicht ungewöhnlich, da im Falle von nicht immobilisierten und anisotropen Proben, z.B. flüssigen Lösungen, C_χ gegenüber A_χ und B_χ kleiner ausfällt (*cf.* Formel (1) - (4)) (Bublitz & Boxer 1997). Im Differenzspektrum von Wasser minus Isopropanol wäre das durch die Hydratisierungsänderungen induzierte Dipolmoment antiparallel zur Orientierung der Azidogruppe ausgerichtet ($\Delta\alpha < 0$) und die Absorption des azF verschiebt sich in Richtung höherenergetischer Strahlung.

In Analogie zum freien azF wurde versucht, das Differenzspektrum von ReaChR-Y110azF auf Basis der Ableitungen des Dunkelspektrums (Y110azF minus WT) aus Abbildung 51D (*rechts*) zu approximieren. Aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-

Verhältnisses konnten die Ableitungen nicht ausgewertet werden. Als alternative Basisfunktion wurde eine Gauß-Glockenkurve verwendet und dessen Ableitungen gebildet. Wie bereits beim freien azF, ist die Annäherung der Daten ungenau (Abbildung 51G). Allerdings lässt sich unabhängig von der Qualität des Fits ein hoher Anteil der zweiten Ableitung konstatieren. Für das inkorporiertes azF wären also Änderungen des Dipolmoments ($\Delta\mu$) der N₃-Funktionalität dominant und die Orientierung der Reportergruppe wäre isotroper Natur.

Bei dominierendem $\Delta\mu$ lässt sich die Form eines Stark-Spektrums auf eine Netto-Verbreiterung des Signals in Anwesenheit des externen elektrischen Felds (F_{ext}) zurückführen. Während nur wenige Stark-Reportergruppen mit einer parallelen (Abbildung 51H, *rot*) bzw. antiparallelen Orientierung ihrer $\Delta\mu$ -Vektoren zum F_{ext} (*blau*) eine Reduktion bzw. Anhebung der Übergangsenergie erfahren, liegt das Gros der Vektoren von $\Delta\mu$ senkrecht zum elektrischen Feld (*grau*) und verschiebt sich quasi nicht (Bublitz & Boxer 1997; Boxer 2009). Unter der Annahme, dass die lichtinduzierten Proteinbewegungen Änderungen des elektrischen Felds des Proteins (ΔF_{Prot}) verursachen, welches der Applikation von F_{ext} in der Stark-Spektroskopie gleichkommen könnte ($\Delta F_{\text{Prot}} \sim F_{\text{ext}}$), lässt sich ein ähnliches Szenario für die Differenzspektren (Licht minus Dunkel) konstruieren. Unter Vernachlässigung jedweder Änderungen der Polarisierbarkeit ($\Delta\alpha = 0$) könnte die Asymmetrie des Y110azF-Differenzspektrums durch eine größere lichtgetriebene Anreicherung von Proteinen mit antiparalleler Orientierung von $\Delta\mu$ der N₃-Gruppe zu ΔF_{Prot} (hypsochrom verschoben) erklärt werden (Abbildung 51H). Alternativ wäre ein Dunkelspektrum mit ausgeprägterer roter Flanke denkbar. In seltenen Fällen ($A_\chi = 0$ & $B_\chi = 0$) lässt sich das Dunkelspektrum durch doppelte Integration von $\Delta A(F)$ rekonstruieren (Boxer 2009). Ein analog generiertes Dunkelspektrum von ReaChR-Y110azF weist ein ν_{max} bei $\sim 2106 \text{ cm}^{-1}$ und eine FWHM von $\sim 19 \text{ cm}^{-1}$ auf und wäre damit ca. 6fach schmaler als das gemessene Dunkelspektrum. Ob nur die mittlere spektrale Komponente in dem Fit des Dunkelspektrums photoaktiv ist und es sich bei den anderen beiden um photoinaktive Subpopulationen handelt, lässt sich hier nicht klären.

3.4.5 Photostationäre FTIR-Differenzspektroskopie

Im Anschluss an die initiale spektroskopische und elektrophysiologische Charakterisierung von ReaChR-Y110azF wurden weitere Aminosäuren innerhalb der mutmaßlichen Ionenpore gegen azF substituiert und in Zellkultur exprimiert. Die Detektion von lokalen Hydratisierungsänderungen *via* FTIR sollte Aufschluss über den Mechanismus der Kanalöffnung und -schließung geben.

Neben Y110 wurde eine weitere Aminosäure im Inneren Tor (N305; H265 in *CrChR2*, cf. Abbildung 54A) sowie drei Reste im ICL1 (Y112, W115 & C119; Y72, W75 & C79 in *CrChR2*) in ReaChR ausgetauscht (Abbildung 52A). Die Studie wurde komplettiert mit Aminosäuresubstitutionen innerhalb des Gegenionenkomplexes (K133; K93 in *CrChR2*) und im extrazellulären Halbkanal (F142 & Y283; F102 & Y243 in *CrChR2*). Die UV-vis-Spektren der

isolierten azF-Mutanten waren bis auf C119azF und K133azF nur leicht spektral verschoben (Abbildung 52B, *links*). Während der Aufreinigung von C119azF war Proteinaggregation zu beobachten (Abbildung 52B, *links*), welche aufgrund von Lichtstreuung zu einer Grundlinienverschiebung im UV-vis-Spektrum führte. Nach einer entsprechenden Korrektur ($\text{Abs. minus } x\lambda^{-4}$) wurde neben der Chromophorbande eine zusätzliche UV-Bande bei ca. 400 nm identifiziert, welche die Dissoziation von Retinal suggeriert. Mutationen des homologen Cysteins in CrChR2 (C79A bzw. S) resultierten in unfunktionalem Protein, d.h. ohne gebundenen Cofaktor (Krause 2016). In Anbetracht dessen ist die hypsochrome Farbverschiebung der C119azF-Mutante eher auf Lichtstreuung, als auf eine stärkere elektrostatische Stabilisierung des Chromophors zurückzuführen. Die leichte bathochrome Farbverschiebung der K133azF-Mutante lässt sich hingegen aber gut mit einer elektrostatischen Destabilisierung des elektronischen Grundzustands erklären. Als Teil des Gegenionenkomplexes und unter physiologischen pH-Bedingungen als Kation vorliegend, bildet es mit der RSBH⁺ und den Gegenionen ein Quadrupol und moduliert die pK_s -Werte der beiden Gegenionen (Li *et al.* 2014). Analoge Lysin-Mutanten führten in P₁ChR2, C1C2 und CrChR2 ebenfalls zu spektralen Rotverschiebungen (Berndt 2011; Govorunova *et al.* 2013; Ito *et al.* 2014; Li *et al.* 2014).

In Bezug auf die generierte Proteinmenge der azF-Mutanten lässt sich, bis auf F142azF, ein negativer Trend in Richtung des C-Terminus bilanzieren (Abbildung 52B, *rechts*). Aufgrund der geringen Ausbeute von Y283azF und N305azF von $m \leq 1 \mu\text{g} / \text{Kulturschale}$ (UV-vis-Spektren nicht gezeigt) konnten keine weiteren spektroskopischen Experimente durchgeführt werden. Die verbleibenden sechs Mutanten wurden schwingungsspektroskopisch untersucht.

Im photostationären (~530 nm, LED-Belichtung) FTIR-Differenzspektrum (Licht minus Dunkel) von ReaChR-Y110azF war neben größeren Änderungen im Amid I-Bereich (1700 - 1620 cm^{-1}) ein markantes IR-Signal im hochfrequenten, nichtproteinogenen Fenster um 2100 cm^{-1} auszumachen, welches im WT nicht auftrat (Abbildung 52C). Das bereits vorab diskutierte Bandenmuster (*cf.* Kapitel 3.4.4) aus einer negativen Bande bei 2108 cm^{-1} und zwei positiven Banden bei 2119 und 2089 cm^{-1} wurde demzufolge Polaritätsänderungen der Azidogruppe zugeordnet. Die Bandenlage des Differenzsignals ist in Übereinstimmung zu publizierten FTIR-Spektren von azF-Mutanten von bovinem Rhodopsin (Ye *et al.* 2009; Ye *et al.* 2010).

In Analogie zu freiem azF (*cf.* Abbildung 51) suggeriert eine Verschiebung zu größeren Wellenzahlen eine Zunahme der Hydratisierung des Labels. Im belichteten Zustand von Y110azF ist jedoch eine hoch- und eine niederfrequente Bande auszumachen, welche jeweils konträre Polaritätsänderungen implizieren. Eine Verschiebung von 11 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen ließe sich gut mit der Kanalöffnung und dem Einfluss von Wasser in den im Dunkelzustand nahezu dehydratisierten Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor erklären. Immerhin verwies das FTIR-Dunkelspektrum derselben Mutante auf eine hydrophobe Markerumgebung im geschlossenen Zustand (*cf.* Abbildung 51D).

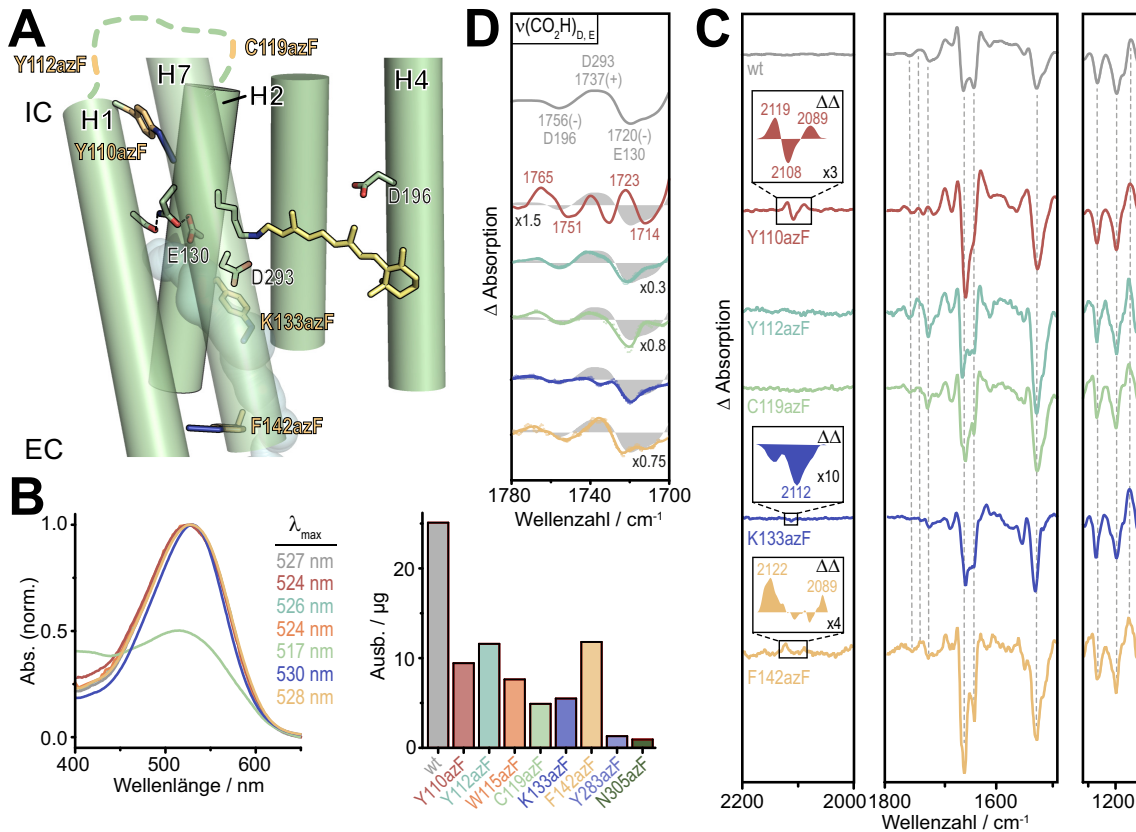


Abbildung 52: Stationäre UV-vis- und FTIR-Spektroskopie von ReaChR-Azidomutanten. **A)** Strukturmodell von ReaChR inkl. der inkorporierten Azidolabels an Position Y110, K133 und F142 (beige). ICL1 ist in der Kristallstruktur von C1C2 nicht aufgelöst (gestrichelte Linie). Modell auf Basis von C1C2 (PDB: 3ug9). **B)** Normierte UV-vis-Spektren der Azidomutanten in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM und deren Absorptionsmaxima (links). ReaChR-C119azF ist instabil und zeigt freies Retinal ($\lambda \sim 400$ nm) sowie Proteinaggregation während der Aufreinigung. Resultierende Lichtstreuung ($\sim \lambda^{-4}$) wurde im Datensatz entsprechend korrigiert. Das korrespondierende Spektrum wurde auf eine Absorption von 0.5 normiert. Berechnung der Ausbeute (μg pro Kulturschale mit 55 cm^2 Wachstumsfläche) der einzelnen Azidomutanten über die Chromophorabsorption mit $\epsilon_{\text{Chrom}} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (cf. Abbildung 29). **C)** Photostationäre FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf Retinal-Bande bei $\sim 1200(-)$ cm^{-1}) von WT und azF-Mutanten in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM nach LED-Belichtung (~ 530 nm) bei 20 °C. Doppeldifferenzspektren ($\Delta\Delta$, $\Delta\text{Abs}_{\text{azF-Mutante}}$ minus $\Delta\text{Abs}_{\text{WT}}$) wurden für den spektralen Bereich der asymmetrischen Azidostreckschwingung berechnet (Einschiebe). Vollständige FTIR-Differenzspektren zwischen 2200 und 1100 cm^{-1} sowie die zugrunde liegenden Dunkelspektren sind im Appendix illustriert (cf. Abbildung A 12 & Abbildung A 13A). **D)** Vergleich der Carbonylschwingungen von protonierten sauren Aminosäureseitenketten ($\nu(\text{CO}_2\text{H})_{\text{D,E}}$). Zuordnung der Banden des WT in Analogie zu Abbildung 46. Daten (Punkte) von Y112azF, C119azF, K133azF und F142azF wurden zur besseren Übersicht geglättet (Linien, Savitzky-Golay: 25 Punkte, Polynom fünften Grades). Spektren wurden ggf. auf den WT (graue Flächen) skaliert. Probenpräparation sowie UV-vis-Messungen wurden von Benjamin Krause und Schwingungsspektroskopie sowie Datenprozessierung von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt.

Neben dem Azidosignal waren auch Änderungen im Carboxylbereich ($1780 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) der Y110azF-Mutante im Vergleich zum WT zu beobachten (Abbildung 52D). Während im photostationären Zustand des WT, E130 ($1720(-)$ cm^{-1}) und D196 ($1756(-)$ cm^{-1}) deprotoniert sowie D293 ($1737(+)$ cm^{-1}) protoniert sind (cf. Abbildung 46A), scheinen E130 und D196 in Y110azF in einem anderen Protonierungszustand vorzuliegen. Das doppelte Bandenmuster bei $1765(+)/1751(-)$ cm^{-1} lässt sich vielmehr mit einer Wasserstoffbrückenbindungsänderung als einer Deprotonierung von D196 vereinbaren

(cf. Abbildung 46B) und wurde in einer nahezu identischen Bandenlage ($1766(+)/1756(-)$ cm^{-1}) für den WT im deprotonierten M-Zustand beobachtet (Kaufmann *et al.* 2017). Das Bandenmuster bei $1723(+)/1714(-)$ cm^{-1} von E130 ließe sich analog interpretieren. Entweder stört der ca. 5 Å (basierend auf Modell) entfernte Label die Deprotonierung von E130 oder die Glutaminsäure des Zentralen Tors ist im photostationären Zustand bereits wieder reprotoniert. Analogerweise könnten schnellere Reprotonierungskinetiken aufgrund einer rapideren Photozyklus-Progression ebenfalls das doppelte Bandenmuster von D196 erklären. Letztere Hypothese ließe sich mit dem ca. zweifach beschleunigten Kanalschluss der Mutante unterstützen (cf. Abbildung 50F).

Als nächstes wurde der IR-Reporter an zwei Positionen im ICL1 (Y112 & C119; cf. Abbildung 52A) eingeführt. Obwohl eine Absorption im hochfrequenten Spektralbereich bei ca. 2100 cm^{-1} in den FTIR-Dunkelspektren zu beobachten war (cf. Abbildung A 12), war kein lichtinduziertes Azidosignal in den photostationären Differenzspektren der beiden Mutanten zu beobachten (Abbildung 52C). Dies deutet auf reduzierte Solvatisierungsänderungen der Azidoumgebung an den entsprechenden Positionen hin.

Im FTIR-Doppeldifferenzspektrum von K133azF (Dunkelspektrum: cf. Abbildung A 12) lässt sich entgegen Y110azF nur eine negative Azidobande bei 2112 cm^{-1} identifizieren, welche im Vergleich zu Y110azF um 4 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschoben und deutlich schwächer ausgeprägt ist. Die kleine Amplitude des Azidodifferenzsignals könnte ebenfalls von einer weitläufigen Überlagerung der Banden im Dunkel- und im belichteten Zustand herrühren. Wie für Y110azF, liegt auch im photostationären Zustand von K133azF ein leicht veränderter Protonierungszustand vor. Die positive Bande des Protonakzeptors (D293, 1737 cm^{-1}) ist in der Mutante nicht ausgeprägt und das Spektrum ähnelt dem der Gegenionenmutante E163T (cf. Abbildung 46). Das Ausbleiben der Bande in E163T wurde mithilfe eines schnelleren Photozyklus mit einer größeren Akkumulation von späten Photozyklusintermediaten argumentiert, in welchen der H^+ -Akzeptor bereits wieder deprotoniert vorliegt. Laut elektrophysiologischen Messungen am homologen Lysin in C α ChR2 (K93I/N), C1C2 (K132A) und P α ChR2 (K76F) sind die Kinetiken des Kanalschlusses bis zu zweifach beschleunigt (Kato *et al.* 2012; Li *et al.* 2014; Richards & Dempski 2017). Kuhne *et al.* (2015) postulierten, dass sich E90 (E130 in ReaChR) nach der Photoaktivierung in Richtung der extrazellulären Seite orientiert, deprotoniert und dann mit K93 (K133 in ReaChR) wechselwirkt. Diese intrahelikale Salzbrücke sorgt für einen großen Porendurchmesser am Zentralen Tor (4.2 Å) und ermöglicht einen starken extrazellulären Wassereinstrom, infolgedessen H2 eine Auswärtsbewegung von 3.9 Å beschreibt. In analogen Simulationen von K93S ist sowohl der Porendurchmesser (1.4 Å) als auch die Kippbewegung von H2 (3.0 Å) reduziert (Eisenhauer 2016). Auf dieser Basis lässt sich ein stabilisierender Effekt der E90-K93-Interaktion in C α ChR2 auf den offenen Zustand postulieren. Durch Störung dieser Wechselwirkung durch Mutagenese eines der beteiligten Reste, könnte der Kanalschluss entsprechend beschleunigt werden. Es wäre daher denkbar, auch einen rapideren Photozyklus von K133azF anzunehmen und die fehlende IR-Bande bei $1737(+)$ cm^{-1} mit einer schnelleren Deprotonierung von D293 zu begründen.

Im belichteten Zustand zeigt F142azF (Dunkelspektrum: *cf.* Abbildung A 12) zwei positive Banden bei 2122 und 2089 cm^{-1} im Azidofenster des Differenzspektrums, eine korrespondierende negative Bande konnte jedoch nicht identifiziert werden. Die Amplitude des Differenzsignals liegt zwischen der von Y110azF und K133azF und impliziert moderate Änderungen der Solvatisierung der Azidogruppe nach Belichtung. Auch diese Interpretation ließe sich mit einem bereits im Dunkelzustand partiell hydratisierten Label vereinbaren. Die Markerbande bei 2122(+) cm^{-1} ist gegenüber Y110azF um 3 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschoben. Das übrige IR-Spektrum inkl. Carboxylbereich ähnelt dem des WT.

3.4.6 Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie

Um die beobachteten Proteindynamiken und lokalen Hydratisierungsänderungen konkreten Photozyklusintermediaten zuordnen zu können, wurde ReaChR und die drei Azidomutanten Y110azF, K133azF und F142azF, welche unter photostationären Bedingungen eine Änderung im FTIR-Differenzspektrum zeigten (*cf.* Abbildung 52C), zeitaufgelösten *rapid-scan*-FTIR-Messungen unterzogen. Abbildung 53A zeigt die Amplitudenspektren des Zerfalls nach Laseranregung ($\lambda_{\text{Exz}} = 532 \text{ nm}$). Mittels globaler Analyse wurden die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) des Zerfalls ermittelt. Anhand der $t_{1/2}$ des WT-Spektrums von 300 ms lassen sich die detektierten Konformationsänderungen gut mit der Kanalschlusskinetik aus elektrophysiologischen Messungen ($\tau_{\text{off}} = 255 \pm 40 \text{ ms}$, *cf.* Abbildung 50F) korrelieren. In zeitaufgelösten UV-vis-Messungen ist in diesem Zeitregime primär der deprotonierte M-Zustand zu sehen (*cf.* Abbildung 31B). Jedoch legten Messungen bei saurem und alkalischem pH (*cf.* Abbildung 31A, C), sowie an einigen Mutanten (*cf.* Abbildung 38C, Abbildung 40A & Abbildung 42A, B) einen reprotonierten N-Zustand ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$, *cf.* Abbildung 31F) offen, welcher im späten Millisekundenbereich populiert und anscheinend im WT bei pH 7.4 vom Dunkelzustand ($\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$) überlagert wird. Folglich rühren die Proteindynamiken in dem Amplitudenspektrum primär vom M- und N-Intermediat.

Wie unter photostationären Bedingungen ($\sim 530 \text{ nm}$ LED-Belichtung) sind für den WT keine Schwingungen im Bereich um 2100 cm^{-1} zu beobachten, allerdings zeigt der Carboxylbereich ein geändertes Bandenmuster (Abbildung 53B). Der scheinbar unterschiedliche Protonierungszustand des WT in den *rapid-scan*-Messungen lässt sich aber zuverlässig mit einem höheren Anteil des deprotonierten M-Zustands aufgrund der Belichtungsfrequenz von 0.4 Hz erläutern. Ein reines M-minus-D-Differenzspektrum konnte mittels eines alternierenden Belichtungsprotokolls (jeweils 5 s $\sim 530 \text{ nm}$ & $\sim 390 \text{ nm}$, LEDs) und anschließender SVD- sowie Rotationsanalyse extrahiert werden (Kaufmann *et al.* 2017). Es zeigt neben einem deprotonierten E130 (1722(-) cm^{-1}) und einer Wasserstoffbrückenbindungsänderung von D196 (1766(+) & 1756(-) cm^{-1}) auch die Protonierung des primären H^+ -Akzeptors D293 an (Abbildung 53B, wt*). Die Bande des H^+ -Akzeptors ist dabei wie in E130Q (*cf.* Abbildung 46A) durch eine bis dato nicht identifizierte negative Bande bei ca. 1737 cm^{-1} überlagert. Da der initiale Protonierungsgrad des Dunkelzustands erst mit Zeitkonstanten von $\tau = 2 \text{ s}$ und $\tau = 71 \text{ s}$ wiederhergestellt wird

(Kaufmann *et al.* 2017), werden die zugrunde liegenden späten Protontransferprozesse bei einer wiederholten Anregung alle 2.5 s (0.4 Hz) größtenteils nicht beobachtet. In den geblizten Amplitudenspektren dominieren also die frühen (De-)Protonierungsreaktionen des Photozyklus. Des Weiteren könnte der zum Dunkelzustand spektral ähnliche O-Zustand, welcher im späten Millisekunden- und frühen Sekundenbereich populiert wird (*cf.* Abbildung 31B), durch die grüne Laserbelichtung ebenfalls angeregt werden (z.B. O \rightarrow K), und nur die Protonierungsänderungen des „abgekürzten“ Photozyklus würden detektiert werden.

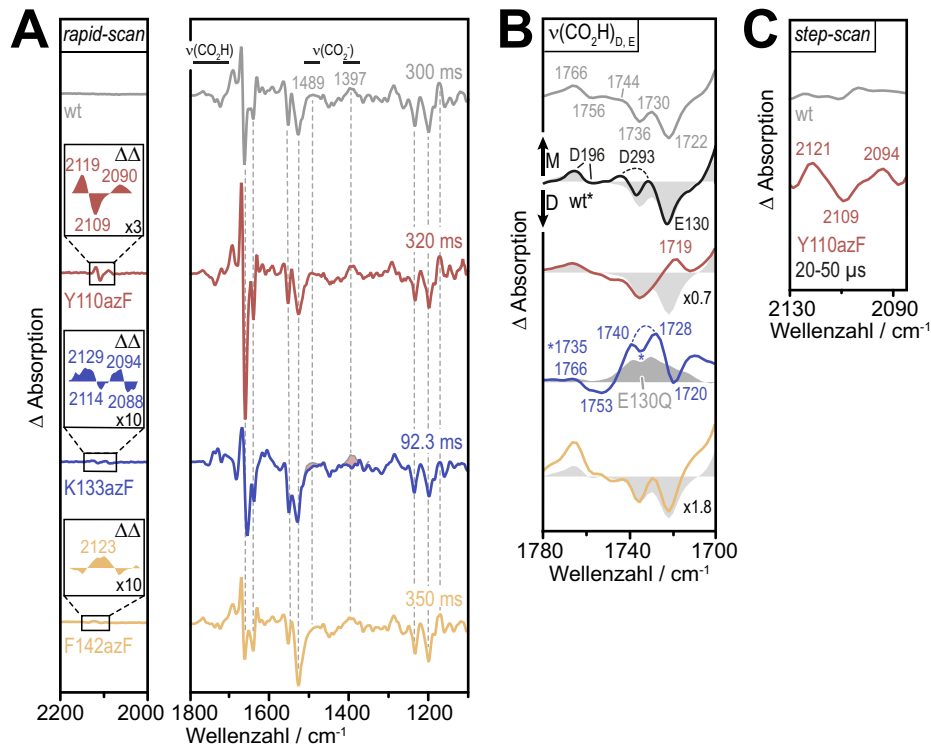


Abbildung 53: Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie von ReaChR-Azidomutanten. **A)** FTIR-Amplitudenspektren (normiert auf Retinal-Bande bei $\sim 1200(-)$ cm^{-1}) des Zerfalls nach Laseranregung (532 nm, 3 - 5 ns, 20 mJ, Belichtungsfrequenz: 0.4 Hz) mit der *rapid-scan*-Methode (Zeitauflösung ≥ 6 ms) in Niedrigsalz-PBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM bei 15 °C. Halbwertszeit des Zerfalls ($t_{1/2}$) wurde mittels globaler Analyse nach Müller & Plesser (1991) bestimmt. Doppeldifferenzspektren ($\Delta\Delta$, $\Delta\text{Abs}_{\text{azF-Mutante}}$ minus $\Delta\text{Abs}_{\text{WT}}$) wurden für den spektralen Bereich der asymmetrischen Azidostreckschwingung berechnet (Einschübe). Mutmaßliche Carboxylat-Schwingungen ($\nu(\text{CO}_2^-)$) des WT sind im K133azF-Spektrum hinterlegt (grau & rot). **B)** Vergleich der Carbonylschwingungen von protonierten Asparagin- und Glutaminsäureseitenketten ($\nu(\text{CO}_2\text{H})_{\text{D,E}}$). wt*, zweite spektrale Komponente einer FTIR-Messungen bei alternierender Belichtung (LEDs: ~ 530 nm & ~ 390 nm, jeweils 5 s, 20 °C) an ReaChR-WT nach SVD und Rotationsanalyse entnommen aus Kaufmann *et al.* (2017). K133azF wurde dem photostationären FTIR-Spektrum (~ 530 nm LED-Belichtung) der E130Q-Mutante bei 20 °C (dunkelgraue Fläche) gegenübergestellt (*cf.* Abbildung 46A). Spektren wurden ggf. auf den WT (hellgraue Flächen) skaliert. **C)** FTIR-Differenzspektren nach Laseranregung wie in A mit der *step-scan*-Methode (theoretische Zeitauflösung: 50 ns) von WT (grau) und Y110azF (rot). Gezeigt sind die gemittelten Spektren von 20 bis 50 μs nach Belichtung mit Fokus auf dem spektralen Fenster der Azidostreckschwingung. Die kompletten *rapid*- und *step-scan*-Spektren zwischen 2600 und 1100 cm^{-1} sind im Appendix illustriert (*cf.* Abbildung A 13B & Abbildung A 15). Probenpräparation wurde von Benjamin Krause und Schwingungsspektroskopie sowie Datenprozessierung von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

Das Amplitudenspektrum der Y110azF zerfällt mit einer ähnlichen Halbwertszeit ($t_{1/2} = 320$ ms) wie der WT ($t_{1/2} = 300$ ms). Das charakteristische Azidosignal sowie eine größere

Intensität der Amid I-Schwingungen wurden in dem geblitzten Spektrum reproduziert. Wie nach LED-Belichtung ist auch nach Laseranregung eine positive Bande im Carboxylbereich ($1719(+)$ cm^{-1}) in der Mutante zu beobachten.

Für K133azF wurde wie in der Referenzmessung eine schwache asymmetrische Streckschwingung der N_3 -Gruppe identifiziert. Im Gegensatz zum photostationären Zustand ist das Signal aber von höherer Komplexität und beinhaltet zwei positive (2129 & 2094 cm^{-1}) und zwei negative Banden (2114 & 2088 cm^{-1}). Die drei konservierten Banden sind gegenüber Y110azF um $4 - 10$ cm^{-1} in den Bereich höherer Frequenzen verschoben, was an der polarerer Umgebung von K133azF im extrazellulären Halbkanal liegen könnte.

Die ca. dreimal schnellere Zerfallskinetik des Amplitudenspektrums ($t_{1/2} = 92.3$ ms) deckt sich mit den kleineren τ_{off} -Werten aus elektrophysiologischen Messungen (Kato *et al.* 2012; Li *et al.* 2014; Richards & Dempski 2017). Neben $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ unterscheidet sich auch das Carboxylbandenmuster je nach Messmethode (photostationär *vs.* *rapid-scan*). Im geblitzten IR-Spektrum sind neben den D196-Banden ($1766(+)$ & $1753(-)$ cm^{-1}) zwei markante positive Banden bei 1740 und 1728 cm^{-1} zu beobachten. Eine korrespondierende negative E130-Bande ist nicht zu sehen. Da ein ähnliches Bandenmuster im photostationären Zustand von E130Q zu beobachten ist, wird angenommen, dass E130 in K133azF nicht deprotoniert wird. Die Reduktion des Carboxylatsignals von deprotonierten Aminosäureseitenketten ($\nu(\text{CO}_2^-)$) bei 1489 und 1397 cm^{-1} erhärtet diesen Verdacht. Ein analoger Zusammenhang wurde ebenfalls für die K93S-Mutante von CrChR2 festgestellt (Kuhne 2016; Eisenhauer 2016). Die Autoren postulierten, dass aufgrund der nicht gebildeten Salzbrücke zu K93, die deprotonierte Form von E90 nicht stabilisiert werden kann und E90 dementsprechend protoniert bleibt. Warum die photostationäre im Vergleich zur *rapid-scan*-FTIR-Messung an der gleichen Probe allerdings unterschiedliche Aussagen zum Protonierungszustand von E130 suggerieren, gilt zu klären. Eventuell ist in ReaChR-K133azF die Deprotonierung von E130 nicht vollständig inhibiert, sondern nur deutlich verzögert (> 2.5 s). Infolgedessen würde das deprotonierte E130 lediglich in dem photostationären Spektrum und nicht in der *rapid-scan*-Messung mit einer Belichtungsfrequenz von 0.4 Hz zu beobachten sein. Alternativ könnte eine Basislinienverschiebung oder eine Überlagerung die ansonsten negative Deprotonierungsbande von E130 beeinflussen. Diese Annahme ließe sich mit zwei Banden bei 1735 und 1720 cm^{-1} rechtfertigen, welche im WT ebenfalls beobachtet werden, und demzufolge nur verschoben sein könnten.

In der Gruppe der drei azF-Mutanten zeigt F142azF wieder die geringsten Veränderungen zum WT. Weder im Carboxylbereich noch im übrigen Spektrum sind signifikante Unterschiede festzustellen und die Kinetik des Amplitudenspektrums liegt ebenfalls in der gleichen Größenordnung. Im Gegensatz zum photostationären Spektrum besteht das Azidosignal in dem geblitzten Pendant nur aus einer ausgeprägten positiven Bande bei 2123 cm^{-1} und weist eine geringere Intensität auf.

Mithilfe der *rapid-scan*-Methode (Zeitauflösung ca. 6 ms) konnten die mit dem Zerfall der beiden Photozyklusintermediate M und N bzw. des Kanalschlusses assoziierten Proteindynamiken und Hydratisierungsänderungen detektiert werden. Um auch frühere

Zeitbereiche zu untersuchen, wurden *step-scan*-Messungen an ReaChR und Y110azF absolviert. In einem gemittelten Spektrensatz zwischen 20 und 50 μs nach Laseranregung wurde nur für die azF-Mutante, das typische Azidobandenmuster mit 2121(+), 2109(-) und 2094(+) cm^{-1} detektiert (Abbildung 53C). Das Ergebnis impliziert eine frühe Hydratisierungsänderung zwischen Innerem und Zentralem Tor, welche mit einer initialen Öffnung des Kanals korrelieren könnte.

3.4.7 Mutationen des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF

Ausgehend von ReaChR-Y110azF, welches über Hydratisierungsänderungen im Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor berichtet, wurden einige Aminosäuren des Inneren Tors modifiziert und deren Einfluss auf die Solvatisierungsdynamiken evaluiert.

Das Innere Tor von C1C2 wird bei einem pH-Wert von 5.8 durch zwei interhelikale Wechselwirkungen zwischen E121 (H2, E82 in CrChR2) und R307 (H7, R268 in CrChR2) sowie E122 (H2, E83 in CrChR2) und H173 (H3, H134 in CrChR2) gebildet (Abbildung 54A, *oben*) (Kato *et al.* 2012). Während die vier genannten Aminosäuren in ReaChR konserviert sind, befindet sich anstelle eines Histidins (H304 in C1C2; H265 in CrChR2) ein Asparaginrest (N305 in ReaChR) an der korrespondierenden Stelle. In Abhängigkeit vom pH-Wert wurde eine unterschiedliche Orientierung und Bindungspartner der Glutaminsäure 122 (E123 in ReaChR) im kristallisierten Dunkelzustand von C1C2 festgestellt (Abbildung 54A, *unten*) (Kato *et al.* 2012; Kato, Kamiya *et al.* 2015).

Im Rahmen der Studie wurde ReaChR-Y110azF mit den Einzelmutationen E122Q, E123Q, N305H, R308H und R308N (E82, E83, H265 & R268 in CrChR2) erweitert. Die rekombinanten Doppelmутanten waren im Vergleich zum parentalen Y110azF um 4 - 6 nm spektral verschoben, wobei aufgrund von Instabilität mancher Mutanten, z.B. Y110azF-N305H, deren UV-vis-Spektren stärkere Lichtstreuung zeigten (Abbildung 54B, *links*). Die Ausbeuten der Doppelmутanten lagen zwischen 2 und 4 μg pro 55 cm^2 Wachstumsfläche und waren gegenüber Y110azF um 56 - 78 % reduziert (Abbildung 54B, *rechts*). ReaChR-Y110azF-R308N zeigte keine Chromophorbindung und konnte auch nicht nachträglich mit Retinal rekonstituiert werden (nicht gezeigt). Die geringeren Expressionslevels der Doppelmутanten korrelieren mit reduzierten lichtgetriebenen Kanalströmen, wobei dieser Trend für Y110azF-N305H aufgrund des großen Fehlers nicht verifiziert werden konnte (Abbildung 54C, *links*). Die Kinetiken des Kanalschlusses sind in allen Doppelmутanten gegenüber Y110azF ($\tau_{\text{off}} = 139 \pm 51$ ms) verlangsamt. Y110azF-E123Q ($\tau_{\text{off}} = 259 \pm 87$ ms) und R308N ($\tau_{\text{off}} = 289 \pm 87$ ms) liegen dabei in der Größenordnung des WT ($\tau_{\text{off}} = 253 \pm 38$ ms), allerdings scheint N305H signifikant langsamer ($\tau_{\text{off}} = 433 \pm 94$ ms) zu sein.

Proben der vier funktionellen Doppelmутanten wurden anschließend mittels zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie (*rapid-scan*, 532 nm, Laser) untersucht (Abbildung 55A). Aufgrund der geringen Probenmenge war der spektrale Bereich > 1800 cm^{-1} in Y110azF-N305H stark verrauscht und die Identifikation einer potentiellen Azidostreckschwingung nicht ohne Weiteres möglich (*cf.* Abbildung A 14). Das Azidobandenmuster von Y110azF-E122Q besteht

aus zwei positiven (2120 & 2092 cm^{-1}) und zwei negativen (2110 & 2081 cm^{-1}) Banden. Im Vergleich zu Y110azF besitzen alle konservierten Banden, außer diejenige bei 2092(+) cm^{-1} , eine höhere Intensität und könnten größere Hydratisierungsänderungen indizieren. Auch die negative Amid I-Oszillation bei $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ weist eine größere Amplitude auf. Ansonsten sind die übrigen lichtinduzierten Proteinschwingungen inkl. Carboxylbanden (Abbildung 55B) bis auf geringere Abweichungen im Amid II-Bereich konserviert. Das Amplitudenspektrum von Y110azF-E122Q zerfällt mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 50 \text{ ms}$ und somit ca. sechsfach schneller als Y110azF ($t_{1/2} = 320 \text{ ms}$). Die schnelleren Proteindynamiken stehen im Kontrast zum langsameren Kanalschluss der Doppelmutante detektiert in elektrophysiologischen Messungen (Y110azF-E122Q: $\tau_{\text{off}} = 185 \pm 52 \text{ ms}$; Y110azF: $\tau_{\text{off}} = 139 \pm 51 \text{ ms}$).

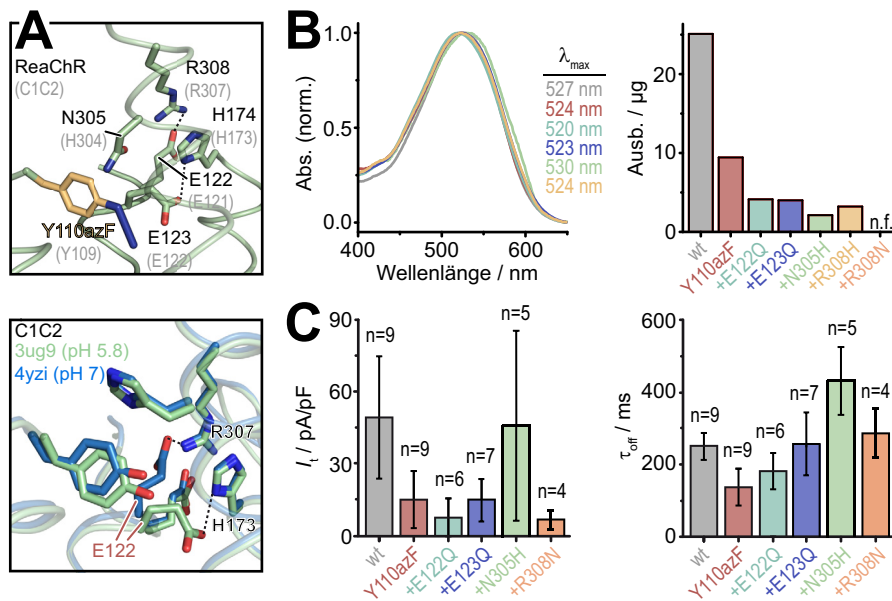


Abbildung 54: Expression und elektrophysiologische Charakterisierung von Mutanten des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF. **A)** Strukturmodell des Inneren Tors von ReaChR inkl. des inkorporierten azF an Position Y110 (beige) auf Basis von C1C2 (oben). Interaktionen in Analogie zu C1C2 bei pH 5.8 (PDB: 3ug9, Reste in C1C2 in Klammern). Überlagerung der beiden C1C2-Kristallstrukturen (unten) bei pH 5.8 (PDB: 3ug9, grün) und pH 7.0 (PDB: 4yzi, blau). **B)** Normierte UV-vis-Spektren inkl. Absorptionsmaxima von Mutanten des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF in DPBS pH 7.4 inkl. 0.03 % (w/v) DDM. Aus dem Spektrum von Y110azF-N305H wurde die Lichtstreuung ($\sim \lambda^{-4}$) herausgerechnet. Berechnung der Ausbeute (μg pro Kulturschale mit 55 cm^2 Wachstumsfläche) der einzelnen Doppelmutanten über die Chromophorabsorption mit $\epsilon_{\text{chrom}} = 33.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (rechts). n.f., keine Chromophorabsorption. **C)** Transiente Photoströme (I_t) bei einer Haltespannung von -60 mV (links) und apparente Zeitkonstanten des Kanalschlusses (τ_{off}) (rechts) nach Belichtung (530 nm, 500 ms). n, Anzahl der Messungen. Probenpräparation, UV-vis-Messungen sowie Transfektionen der HEK293T-Zellen für die elektrophysiologische Charakterisierung wurden von Benjamin Krause durchgeführt. Elektrophysiologische Messungen wurden von Johannes Vierock (AG Hegemann, HU Berlin) absolviert.

Während alle proteinogenen Vibrationen in der Doppelmutante Y110azF-E123Q konserviert vorliegen, ist keine Azidoschwingung auszumachen. In Analogie zu Y112azF und C119azF (cf. Abbildung 52C) könnte das komplette Ausbleiben von $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ damit begründet werden, dass sich die Polarität der Umgebung der Reportergruppe im Rahmen des Photozyklus

nicht ändert. Nichtsdestotrotz erscheint diese Überlegung aufgrund der großen Solvatisierungsänderungen von ReaChR-Y110azF als verwunderlich. Die Zerfallskinetik des Amplitudenspektrums ($t_{1/2} = 250$ ms) von Y110azF-E123Q korreliert mit dem zeitlichen Verlauf des Kanalschlusses im WT und in der Doppelmutante.

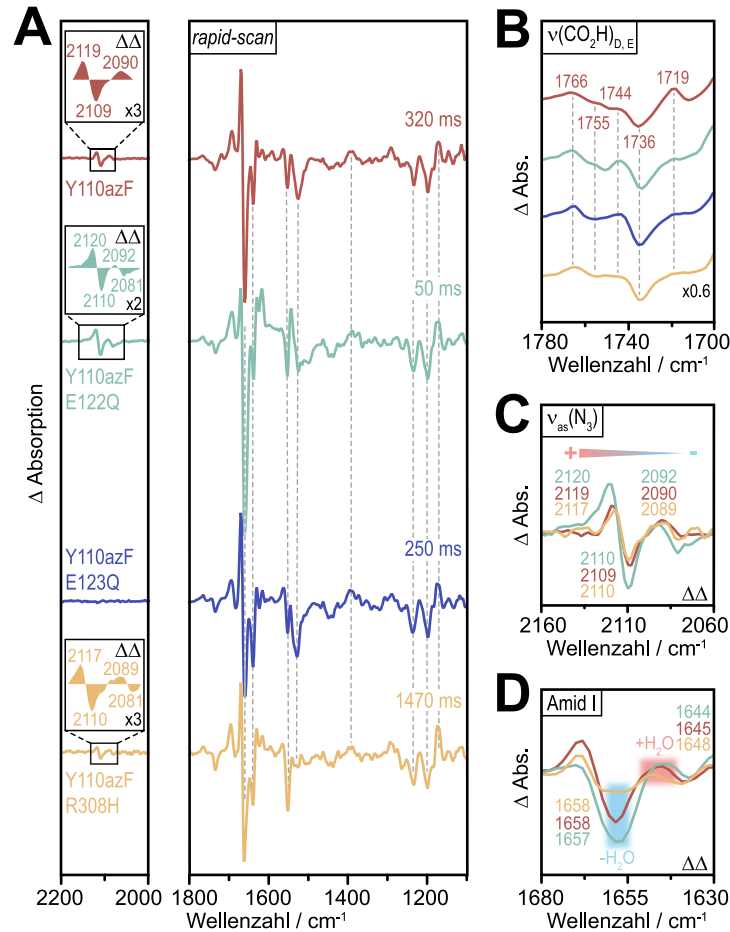


Abbildung 55: Rapid-scan-FTIR-Spektroskopie von Mutanten des Inneren Tors auf Basis von ReaChR-Y110azF.
A) FTIR-Amplitudenspektren (normiert auf Retinal-Bande bei ~ 1200 cm $^{-1}$, *rapid-scan*) des Zerfalls nach Laseranregung (532 nm, 20 mJ, 3 - 5 ns, Blitzfrequenz: 0.4 Hz) dreier Doppelmutanten im Vergleich zu ReaChR-Y110azF (*mt*) in Niedrigsalz-PBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) des Zerfalls sind gelistet. Berechnete Doppeldifferenzspektren ($\Delta\Delta$, $\Delta\text{Abs}_{\text{azF-Mutante}}$ minus $\Delta\text{Abs}_{\text{WT}}$) der Azidostreckschwingungsbanden sind gezeigt (Einschübe). Das verbauchte Y110azF-N305H sowie die übrigen FTIR-Spektrensätze sind im Appendix angehängt (*cf.* Abbildung A 13B & Abbildung A 14). **B)** Vergleich der Carbonylschwingungen von protonierten sauren Aminosäureseitenketten ($\nu(\text{CO}_2\text{H})_{\text{D,E}}$) innerhalb der Doppelmutanten. Die Amplitude des Spektrums von Y110azF-R308N wurde entsprechend skaliert. **C)** Vergleich der asymmetrischen Azidostreckschwingungen ($\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$) in den Doppeldifferenzspektren der drei IR-aktiven Mutanten. **D)** Vergleich des Amid I-Bereichs ($\Delta\Delta$, $\Delta\text{Abs}_{\text{azF-Mutante}}$ minus $\Delta\text{Abs}_{\text{WT}}$) der drei IR-aktiven azF-Mutanten. Probenpräparation wurde von Benjamin Krause und FTIR-Spektroskopie von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

Das FTIR-Differenzspektrum von ReaChR-Y110azF-R308H zeigt wie Y110azF-E122Q ein viergliedriges Azidosignal bestehend aus zwei positiven (2217 & 2089 cm $^{-1}$) und zwei negativen Banden (2110 & 2081 cm $^{-1}$). Die positiven, d.h. lichtinduzierten Banden, sind

gegenüber Y110azF bzw. Y110azF-E122Q um 1 - 2 cm^{-1} bzw. 3 cm^{-1} in den niederfrequenten Spektralbereich verschoben, während die Lage der negativen Dunkelzustandsbanden nahezu unverändert ist (Abbildung 55C). Da die Verschiebung von $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ zu größeren Wellenzahlen mit einem Polaritätszuwachs einhergeht (negativer Solvatochromismus), würde die E122Q-Mutation im Vergleich zur Y110azF-Referenz größere und Y110azF-R308H kleinere Hydratisierungsänderungen bewirken. Trotz des Y110azF-ähnlichen Spektrums klingen die Konformationsänderungen in Y110azF-R308H ca. 4.5fach langsamer ($t_{1/2} = 1470 \text{ ms}$) ab als in der einfachen azF-Mutante. Auch dieser Trend ließe sich mit einer verlangsamten Kanalschlusskinetik der ähnlichen Asparagin-Mutante (Y110azF-R308N) vereinbaren (cf. Abbildung 54C, *rechts*).

Abschließend wurden die Amplituden der Amid I-Oszillationen der drei IR-aktiven Doppelmутanten miteinander verglichen. In den Doppeldifferenzspektren (azF-Doppelmутante minus WT) ist ein Bandenmuster mit zwei positiven und einer negativen Bande zu beobachten, welches von der Form dem typischen Azidosignal ähnelt (Abbildung 55D). Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* (2015) ordneten das Bandenpaar bei 1665(-) und 1648(+) cm^{-1} in C7ChR2 C=O-Schwingungen des Proteinrückgrats zu. Die Autoren korrelierten die lichtgetriebene Rotverschiebung um 17 cm^{-1} mit der Hydratisierung der α -helikalen Proteinsegmente. In Anbetracht dessen wurden die negativen Banden bei 1658 bzw. 1657 cm^{-1} in den ReaChR-Doppelmутanten mit dehydratisiertem und die positiven Banden zwischen 1648 und 1644 cm^{-1} mit hydratisiertem Protein assoziiert. Bemerkenswerterweise stimmt die Amplitude der Amid I-Differenzsignale gut mit der Intensität der korrespondierenden Azidovalenzschwingungen überein. Demzufolge könnten die mutageneseinduzierten Solvatisierungsänderungen auch anhand der Amid I-Vibrationen der beiden Markerbanden identifiziert werden.

4. Diskussion

4.1 Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in *Escherichia coli*

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, Rhodopsindomänen von sechs Kanalrhodopsinen (*CrChR1*, *CrChR2*, *CaChR1*, *DsChR1*, *HpChR1* und *PgChR1*) und zwei Histidin-Kinase-Rhodopsinen (*CrHKR1* & *OrHKR1*) aus *E. coli* zu exprimieren. Auch wenn die meisten Proteine bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnten (cf. Abbildung 21), führte weder der Einsatz von verschiedenen starken Promotorsystemen (P_{BAD} , *tetA* & T7) und unterschiedlichen Expressionsstämmen (C41(DE3), C43(DE3) & CLM24) noch die Expression bei teils reduzierten Temperaturen (37, 30, 19 & 10 °C) in Ab- und Anwesenheit von kälteadaptierten Chaperonen zu einer Cofaktorbindung (cf. Tabelle 31). Auch die Fusionierung des α -helikalen Membranproteins Mistic aus *Bacillus subtilis* resultierte lediglich in Apoprotein.

Circa zwei Jahre nach Einstellung der prokaryotischen Expressionsversuche wurde von der ersten Expression aus *E. coli* mit einem ähnlichen Ansatz berichtet. Die Arbeitsgruppe um Prof. Jung bediente sich einer doppelten Mistic-Fusion an beiden Termini des C-terminal verkürzten *CrChR2* (1 - 300 AS). Im Zuge der Aufreinigung konnten jedoch die beiden Auxiliare nicht unter Verlust der Chromophorabsorption vom ChR getrennt werden (Lee *et al.* 2015). Das UV-vis-Spektrum des Fusionskonstrukts zeigte sein Maximum bei 500 nm, ca. 30 nm rot-verschoben gegenüber Protein aus COS-1 bzw. *P. pastoris* (Ritter *et al.* 2008; Bamann *et al.* 2010), und war zudem stark mit hämtragenden Cytochromen verunreinigt. Auch wenn lichtinduzierte Änderungen sowie die Formation rhodopsintypischer Photointermediate zu beobachten waren, war die Abklingkinetik eines P_{520} -ähnlichen Zustands mit $\tau = 146$ ms ca. 15 Mal gegenüber rekombinantem *CrChR2* aus *P. pastoris* oder COS-1-Zellen ($\tau = 10$ ms) verlangsamt (Ritter *et al.* 2008; Bamann *et al.* 2008).

Wenn PTMs, wie z.B. Glykosylierung und Phosphorylierung, für die funktionelle Expression von ChRs aus *E. coli* unabdingbar sind, könnte der mangelnde Erfolg der heterologen Expression zumindest teilweise begründet werden. In Eukaryoten stellt die N-Glykosylierung die am häufigsten auftretende Proteinmodifikation dar. Laut einer bioinformatischen Vorhersage mit dem NetNGlyc 1.0 Server (Blom *et al.* 2004) weisen die sechs untersuchten ChRs keine bis drei extrazelluläre eukaryotische Konsensus-Motive N-X-S/T ($X \neq P$) auf (cf. Abbildung 20). *CrChR2*-H134R ist an N24 glykosyliert und die Inhibierung der Glykosylierung durch eine S26D Mutante verursachte eine starke Einbuße an rekombinantem Protein (Bruun 2013). Bovines Rhodopsin hat zwei N-terminale Glykosylierungsstellen an N2 und N15 und trägt jeweils ein Hexasaccharid vom Typ $Man_3GlcNac_3$ (Man, Mannose; GlcNac, N-Acetylglucosamin) (Fukuda *et al.* 1979). Mutagenese der N15-Glykosylierungsstelle hatte eine schlechte Proteinfaltung und eine deutlich geringere Effizienz der G_i -Protein-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp zur Folge (Kaushal *et al.* 1994). Analoge N15-Mutationen in humanen Rhodopsin führten zum Absterben

der Stäbchen (Tam & Moritz 2009). Folglich kann also zumindest ein positiver Einfluss des gebildeten *N*-Glykans konstatiert werden.

Um Glykosylierungen von heterolog exprimierten Proteinen auch in dem prokaryotischen Expressionswirt zu ermöglichen, wurde *E. coli* mit dem *pgl*-Gencluster (engl. *protein glycosylation*) des Eubakteriums *Campylobacter jejuni* kotransformiert (Wacker *et al.* 2002). Fünf der sechs ChRs wurden in Anwesenheit von Pgl in dem designierten Glykosylierungsstamm CLM24 exprimiert und die separierten Zellfraktionen auf ihr Affinitätspeptid hin untersucht. Für CrChR1 (drei vermeintliche extrazelluläre *N*-Glykosylierungsstellen) konnte für die Expression in CLM24 nur eine markante Bande im Größenbereich des Monomers identifiziert werden. In den Negativkontrollen (C41(DE3) & C43(DE3)) wurde eine Bande derselben Größe beobachtet (*cf.* Abbildung 20B). Da eine Glykanbildung abhängig von der gebundenen Kohlenhydratkette (Man₃GlcNac₃ *vs.* Glc₃Man₉GlcNac₂) mit einem Massezuwachs von ca. 1.2 - 2.6 kDa einhergeht, liegt die Vermutung nahe, dass für die untersuchten ChRs keine *N*-Glykosylierung erreicht wurde. Auch wenn die Komposition und Größe des assoziierten Oligosaccharids vom jeweiligen Expressionswirt abhängt, sollte dennoch eine weitere höhermolekulare Bande auftauchen, gerade wenn mehrere Asparagine, wie im Falle von CrChR1, glykosyliert werden könnten.

Obwohl sich einige Berichte über die erfolgreiche Glykosylierung von Membranproteinen, u.a. Omp's (engl. *outer membrane protein*) (Fisher *et al.* 2011), mittels Koexpression von Pgl in der Literatur finden, scheint das System eher prädestiniert für lösliche und periplasmatische Proteine zu sein. Ein Hauptgrund mag der späte Glykosyltransfer im Spenderorganismus *C. jejuni* (post-translational) im Vergleich zum co-translationalen Transfer in Eukaryoten sein. Des Weiteren könnte die Anwesenheit des eukaryotischen Tripeptids (N-X-S/T; X ≠ P) unzulänglich für die Erkennung der Oligosaccharyltransferase PglB sein, so dass eine kovalente Verknüpfung zum Zielprotein ausbleiben würde. Es wurde berichtet, dass ein ausgedehntes Konsensus-Motiv (D/E-X-N-Z-S/T; X, Z ≠ P) die Effizienz der Glykosylierung verbessern würde (Nita-Lazar *et al.* 2004; Kowarik, Young *et al.* 2006). Dieses findet sich aber dennoch einmal im N-Terminus des CrChR1-Gens. Unabhängig von den präsentierten Resultaten könnten massenspektrometrische Analysen weitere Klarheit über eine erfolgte Glykosylierung schaffen.

Bemessen an der durchgeführten Proteinanalytik und an den gemessenen UV-vis-Spektren ist es ohne Frage, dass die heterologe Expression von mikrobiellen Rhodopsinen in *E. coli* stattfindet, dennoch war in keinem Fall eine Chromophorbindung zu beobachten (*cf.* Abbildung 21D). Ob diese durch die rapide Faltung im prokaryotischen Wirtsorganismus nicht ermöglicht wurde, mit den fehlenden PTMs korreliert oder während der Aufreinigung, vor allem im Solubilisierungsschritt, der Cofaktor dissoziierte, konnte hier nicht geklärt werden. Zum letztgenannten Punkt muss aber auf die simplere Lipidzusammensetzung der Membranen von gram-negativen Prokaryoten im Vergleich zu eukaryotischen Wirtsorganismen hingewiesen werden (Tabelle 33). Obwohl DDM als „Standard“-Detergens für zahlreiche Proteinpräparationen erfolgreich eingesetzt wurde, vermag es eventuell nicht die heterolog exprimierten ChRs schonend aus der *E. coli*-Membran zu solubilisieren. Immerhin war

die Membranfraktion einiger Proteinpräparationen häufig orange bis rötlich gefärbt, von der Anreicherung von rötlichen Cytochromen der *E. coli*-Atmungskette mal abgesehen (cf. Abbildung 21D, Soret-Bande bei $\lambda \sim 412$ nm). Als indirekter Hinweis kann auf eine aktuelle Publikation hingewiesen werden. Doi *et al.* exprimierten das anionenleitende Chr2 aus *Guillardia theta* (GtACR2) in *E. coli* und konnten in einer salinen Zellsuspension wellenlängenabhängige pH-Wert-Änderungen induzieren (Doi *et al.* 2017). Das extrahierte Aktionsspektrum ($\lambda_{\max} = 460$ nm) war in guter Übereinstimmung zu früheren elektrophysiologischen Charakterisierungen ($\lambda_{\max} = 470$ nm) (Govorunova *et al.* 2015), was eine erfolgreiche Inkorporation des Cofaktors suggeriert. Überraschenderweise wurden jedoch keine Absorptionsspektren von isoliertem Protein gezeigt.

Tabelle 33: Zusammensetzung von Lipidmembranen in verschiedenen Organismen. CL, Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin); PA, Phosphatidsäure; PC, Phosphatidylcholin (Lecithin); PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; PL, Phospholipide; PS, Phosphatidylserin. Werte sind entnommen aus Opekarová & Tanner (2003).

Organismus	Fraktion	Komposition
<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	Innere Membran	70 - 80 % PE, 15 - 20 % PG, 5 % CL
<i>Pichia pastoris</i> (Hefe)	Zellextrakt	38 % PC, 28 % PS, 18 % PE, 11 % PI, 3 % PA, 2 % CL
<i>Spodoptera frugiperda</i> Sf9 (Insekt)	Zellextrakt	35 - 43 % PC, 17 - 23 % PI, 36 % PE, 4,6 - 4,7 % CL
<i>Xenopus</i> -Oozyten (Frosch-Eizellen)	Zellextrakt	19 % PE, 65 % PC, 10 % PI, 2 % PS, 5 % Sphingomyelin, 0,6 - 0,7 mol Cholesterol/PL
BHK21 (Hamster-Nierenzellen)	Plasmamembran	29 % PE, 26 % PC, 24 % Sphingomyelin, 18 % PS; 3 % PI, 0,9 mol Cholesterol/PL

Es stellt sich außerdem die Frage nach der Stabilität des Apoproteins und der Möglichkeit einer nachträglichen Rekonstitution, wie es im Falle von ReaChR aus HEK293T-Zellen gezeigt werden konnte (cf. Abbildung 27E). Eventuell sind die untersuchten ChRs ohne ihren Cofaktor instabil und es bedarf stabilisierender Mutationen. Diese Hypothese lässt sich gut mit Studien an anderen mikrobiellen Rhodopsinen in Einklang bringen. Während das Apoprotein von CrChR2 zu Proteinaggregation tendiert, führen aromatische Substitutionen des Threonin 159 innerhalb der Retinal-Bindetasche zu einer erhöhten Stabilität des Opsins (Ullrich *et al.* 2013). Die Bindung des Cofaktors in BR führt zu einer Nettostabilisierung von 17 kcal mol⁻¹ (Curnow & Booth 2010). Obwohl ein deutlicher Überschuss an Retinal (5 - 10 μ M) während der Expression zugegeben wurde, ist es denkbar, dass *E. coli* den Cofaktor metabolisiert und er dadurch nach kurzer Zeit nur noch substöchiometrisch vorliegt. Jedoch führten zusätzliche Rekonstitutionsschritte auf Zell- bzw. Membranebene zu keiner Bildung einer Absorptionsbande jenseits des freien Cofaktors ($\lambda_{\max} > 390$ nm) (nicht gezeigt).

Kato *et al.* (2012) identifizierten die ersten 23 AS der C1C2-Chimäre als Signalsequenz, welche nach dem co- bzw. post-translationalen Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wahrscheinlich durch eine Signalpeptidase abgespalten wird. Diese Überlegung lässt sich gut mit der bioinformatischen Prognose *via* SignalP (Petersen *et al.* 2011) bestätigen.

Demzufolge wird die Polypeptidkette von C1C2 zwischen G22 und A23 gespalten. Auch für das parentale *CrChR1* sowie *DsChR1* und *HpChR1* lässt sich ein Signalpeptid einer Länge von 22 bzw. 27 AS voraussagen (Tabelle 34). Obwohl *E. coli* nicht kompartimentiert ist und auch kein ER sowie einen Golgi-Apparat besitzt, wird auch hier ein zielgerichteter Transport in die Zellmembran(en) oder den periplasmatischen Raum durch Signalpeptide mediiert. Das ist gerade für die Ausbildung von Disulfidbrücken essentiell, da diese im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas nicht gebildet werden können.

Es stehen drei verschiedene Sekretionswege zur Auswahl: 1) Sec-Translocon 2) Signalerkennungspartikel (engl. *signal recognition particle*, SRP) 3) Twin-Arginin-Transport (TAT). Während im Sec-Weg das Protein post-translational transportiert wird, wird das naszierende Protein im SRP-Weg co-translational transloziert. In beiden Fällen wird das Protein im ungefalteten Zustand über die Cytoplasmamembran *via* Sec-Translocon transportiert. Im Gegensatz dazu findet der Transport im TAT-Weg post-translational statt und das Protein ist bereits vollständig gefaltet. Die meisten sekretierten Proteine in *E. coli* folgen dem Sec-katalysierten Weg (Blobel & Dobbenstein 1975; Fekkes & Driessen 1999; Robinson & Bolhuis 2004).

Ein Grund für den hohen Anteil an Einschlusskörperchen innerhalb der *E. coli*-Expressionen könnte eine gewisse Inkompatibilität der pflanzlichen Signalpeptide mit dem prokaryotischen Transport- und Verteilungssystem darstellen. Obwohl sich in der Vielzahl an tierischen, pflanzlichen bzw. bakteriellen Signalpeptiden keine hohe Sequenzhomologie findet, sind ihre physikochemischen Eigenschaften hoch konserviert (Izard & Kendall 1994). Alle Peptide sind ca. 18 - 30 AS lang und bestehen im Wesentlichen aus drei Regionen: Einem positiv geladenen N-Terminus, welcher von einem apolaren hydrophoben Kern gefolgt wird, und einer polarerer C-terminalen Domäne (Tabelle 34). Die genauen Kriterien, welche schlussendlich über den Sekretionsweg und die finale Destination, z.B. Periplasma *vs.* äußere Zellmembran, determinieren, sind anhand der Primärsequenz nicht auszumachen und bis dato unzureichend verstanden. Die identifizierten Signalpeptide der drei ChRs sind zwar auch aus den drei charakteristischen Segmenten aufgebaut, dennoch stellt sich die Frage, ob sie von dem bakteriellen System richtig erkannt werden und zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort dirigiert werden können. Neben den natürlichen Signalsequenzen wurde im Rahmen der Arbeit der Einfluss eines Sec-abhängigen Signalpeptids (PelB) auf den Proteintransport von *PgChR1* analysiert. Weder bei einer Expressionstemperatur von 19 °C noch bei 10 °C konnte ein positiver Effekt bilanziert werden (*cf.* Tabelle 31). Es scheint allerdings an intrinsischen Eigenschaften des *PgChR1* zu liegen, da es für die Expression von *GtACR2* sowie für SRII aus *H. salinarum* einen Nutzen zu haben schien (Mironova *et al.* 2005; Doi *et al.* 2017).

Um sich einer eventuellen Signalpeptid-Problematik gänzlich zu entziehen, wurde von Doi *et al.* ein alternativer Ansatz verfolgt. Die Experimentatoren kreierten eine N-terminal verkürzte Variante von *CrChR1* (82 - 308 AS) und exprimierten sie in *E. coli* (Doi *et al.* 2015). Auch in diesem Fall ist eine (vollständig) funktionelle Expression zu bezweifeln, da lediglich ein Hydroxylamin-gebleichtes Absorptionsdifferenzspektrum sowie eine pH-Titrationsreihe von hydrolysiertem Retinal als Evidenzen angeführt wurden. In der designten Version konnten kaum

bis keine lichtinduzierten Absorptions- sowie pH-Änderungen in Zellsuspension induziert werden. Sowohl die bakterielle Na⁺-Pumpe KR2 als auch SRII aus *N. pharaonis* tragen keine Signalsequenzen und werden trotzdem im hohen Maße in die Membran dirigiert (Royant *et al.* 2001; Kato, Inoue *et al.* 2015; Gushchin *et al.* 2015). Im Gegensatz dazu trägt Archäerhodopsin-3, welches erfolgreich aus *E. coli* aufgereinigt werden konnte, nur ein kurzes sechs AS-langes Propetid (Ihara *et al.* 1999; Sineshchekov *et al.* 2012; Hochbaum *et al.* 2014).

Tabelle 34: Pflanzliche und bakterielle Signalsequenzen. Signalsequenzen der ChRs wurden mit SignalP vorhergesagt. Positiv geladene N-terminale Region (*kursiv*), apolarer hydrophober Kern (*fett*) und mehr polare C-terminale Region (*Roman*) sind markiert.

Signalsequenz	Länge	Protein	Organismus	Sekretion	Referenz
MSRRP- WLLALALAVALA -AGSAG	22 AS	ChR1, Plasmamembran	<i>C. reinhardtii</i> (Alge)	?	-
MRI- CLGLLAVALATLTL -PCPPVNA	24 AS	ChR1, Plasmamembran	<i>H. pluvialis</i> (Alge)	?	-
MRRRE- SQLAYLCLFVLIAGWA -PRLTES	27 AS	ChR1, Plasmamembran	<i>D. salina</i> (Alge)	?	-
MKYLLP- TAAAGLLLLA -AQPAMA	22 AS	Pektat-Lyase B (PelB), Periplasma	<i>Erwinia carotovora</i> (Bakterium)	Sec	Lei <i>et al.</i> , 1987
MKKT- AIAIAVALAG -FATVAQA	21 AS	Outer membrane protein A (OmpA), äußere Zellmembran	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	Sec	Choi & Lee, 2004
MKKI- WLALAGLVL -AFSASA	19 AS	Disulfid Oxidoreduktase A (DsbA), Periplasma	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	SRP	Schierle <i>et al.</i> , 2003

ChR1 aus *Pyramimonas gelidicola*, für welches hier die meisten Bedingungen getestet wurde, konnte in den Händen der Arbeitsgruppe von Prof. Sudo auch nicht funktionell exprimiert werden (Doi *et al.* 2017). Daher mag das Ausbleiben des Erfolgs zum Teil an der einzigartigen Architektur von PgChR1, mit seinem ungewöhnlich kurzen N-Terminus (7 AS) sowie des ausgedehnten extrazellulären Loop 2 (39 AS; 19 AS in C1C2), liegen. Gegen Ende der Studien wurde eine humanadaptierte Sequenz des PgChR1 in *Xenopus*-Oozyten getestet (Dr. Arend Vogt, AG Hegemann, HU Berlin), jedoch konnten keine lichtinduzierten Kanalströme beobachtet werden (nicht gezeigt).

Es bedarf daher noch vieler weiterer Experimente und Tests, um das simple Expressionssystem für eine breitere Masse und eine größere Anzahl von mikrobiellen Rhodopsinen kompatibel zu machen. Grundsätzlich stellt sich jedoch die Frage, ob es den wachsenden Ansprüchen, gerade von Seiten der Strukturbioologie, genüge tragen kann und ob eine Daseinsberechtigung neben *P. pastoris*, Insektenzellen sowie zellfreien Expressionssystemen jemals erreicht wird.

4.2 Expression von Kanalrhodopsinen in HEK293T

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll für ChRs aus HEK293T-Zellen etabliert (*cf.* Kapitel 2.4.18 & 2.4.21), mit welchem solide Proteinmengen ($m \leq 25 \mu\text{g} / 55 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche) von insgesamt 8 verschiedenen ChRs (*CrChR2*, *C1C2*, *CoChR*, *Chronos*, *C1V1-25A*, *ReaChR*, *Chrimson* und *CsChrimson*) (*cf.* Tabelle 32, Abbildung 27D, Abbildung 48C, Abbildung A 3 & Abbildung A 8A) sowie 12 konventionellen und 20 Amber-Mutanten generiert werden konnte. Das exprimierte Protein war sehr rein und die produzierte Menge war ausreichend für spektroskopische Experimente (UV-vis, FTIR). Die signifikant größere Proteinmenge aus transient transfizierten HEK293T-Zellen im Vergleich zu ihren parentalen Vorgängern (HEK293), scheint kein Resultat der leicht modifizierten Aufreinigungsbedingungen zu sein, sondern ist eher in der höheren intrazellulären DNA-Konzentration zu begründen. Letztere beruht auf der vom SV40 großen T-Antigens mediierten Replikation der transfizierten DNA. Obwohl unter Annahme einer hundertprozentigen Transfektionseffizienz, welche sicher nicht erzielt wird, schätzungsweise ~ 75.000 DNA-Moleküle pro Zelle ($13.24 \mu\text{g DNA} / \sim 27 \times 10^6$ Zellen) vorhanden sind, scheint diese Menge nicht ausreichend zu sein, um eine vernünftige Proteinmenge zu generieren, sondern es bedarf für gute Proteinausbeuten der zellulären Amplifikation der eingebrachten Fremd-DNA.

4.3 Farbverschiebung in ReaChR

Eine der Motivationen dieser Arbeit war die Untersuchung der spektralen Lage der Chromophorbanden einiger ChRs, welche z.B. für *CrChR2* bei $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ und für *ReaChR* bei $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$ liegen (Abbildung 56B). Für optogenetische Anwendungen ist die Verwendung eines ChRs mit rot-verschobenem λ_{max} erstrebenswert, da kurzwelliges Licht stärker von lipidhaltigen Geweben gestreut sowie dessen Intensität durch die Absorption endogener Farbpigmente wie z.B. Hämoglobin abgeschwächt wird (Tromberg *et al.* 2000; Marblestone *et al.* 2013). Die Aufklärung der Farbverschiebung in Rhodopsinen stellte ein Paradigma innerhalb der Rhodopsin-Forschungsgemeinschaft dar und konvergierte unter Annahme einer gleichen Planarität des konjugierten Systems im Wesentlichen in zwei Mechanismen (Ernst *et al.* 2014). Während im elektronischen Grundzustand (S_0) die positive Ladung am Stickstoff lokalisiert ist, findet im ersten angeregten Zustand (S_1) ein Charge-Transfer in Richtung des β -Ionon-Rings statt (Song *et al.* 1993; Schenkl *et al.* 2005). Infolgedessen können (partiell) negativ geladene Aminosäuren der Proteinumgebung abhängig von ihrer Orientierung entweder S_0 bzw. S_1 stabilisieren und so den Energieunterschied zwischen beiden Niveaus beeinflussen.

Auf Basis eines Sequenzvergleichs unterscheiden sich *CrChR2* und *ReaChR* in einigen Resten innerhalb der Retinal-Bindetasche. Während die beiden vermeintlichen Gegenionen konserviert sind, weist *ReaChR* zwei Substitutionen am β -Ionon-Ring (T159C & G181S,

CrChR2-Nomenklatur) und eine nahe der RSB (S256A) auf (Abbildung 56A). Die einzelnen Mutationen auf CrChR2 führen zu einer Rotverschiebung um 3 nm (T159C) (Schneider 2014) bzw. 13 nm (G181S) (Schneider *et al.* 2015) und für C1V1-25 ($\lambda_{\max} = 539$ nm, hohe Sequenzhomologie zu ReaChR) zu einer Blauverschiebung um 18 nm (A256S) (Prigge 2012). Im hypothetischen Fall, dass alle Effekte synergistisch wirken, wäre eine Farbverschiebung von 34 nm durch den Austausch der drei Aminosäuren zu erklären. Die Addition dieser bathochromen Farbverschiebung zum CrChR2-Dunkelspektrum würde in einem Absorptionsmaximum bei 504 nm resultieren. Das so berechnete λ_{\max} entspricht dem von ReaChR unter alkalischen pH-Bedingungen (*cf.* Abbildung 30), wirft jedoch die Frage auf, welche Faktoren die fehlenden 23 nm erklären könnten.

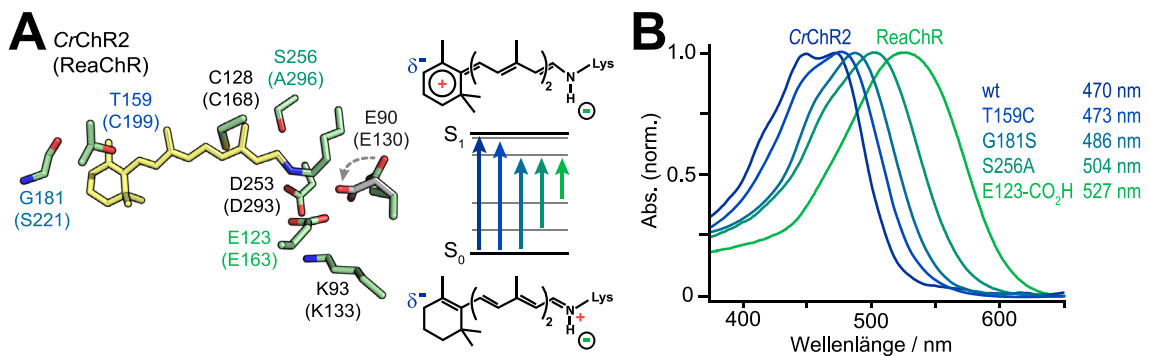


Abbildung 56: Farbverschiebung von CrChR2 nach ReaChR. **A)** Strukturmodell der Retinal-Bindetasche von CrChR2 auf Basis der C1C2-Kristallstruktur (PDB: 3ug9). Korrespondierende Reste in ReaChR sind genannt (*in Klammern*). Der Einfluss der Aminosäuresubstitution auf den Energieunterschied zwischen elektronischem Grund- (S_0) und erstem angeregtem Zustand (S_1) ist skizziert. E90 ist ebenfalls in einer zur extrazellulären Seite hin orientierten Rotation dargestellt (*grün*). **B)** UV-vis-Spektren von CrChR2 bei pH 7.4 („wt“: E123-CO₂), C1C2 bei pH 4 („T159C“: E123-CO₂-T159C), Chronos bei pH 7.4 („G181S“: E123-CO₂-T159C-G181S), ReaChR bei pH 10 („S256A“: E123-CO₂-T159C-G181S-S256A) und ReaChR bei pH 7.4 („E123-CO₂H“: E123-CO₂H-T159C-G181S-S256A“). Spektrale Verschiebung der Einzelmутanten wurde entnommen aus Prigge (2012); Govorunova *et al.* (2013); Schneider (2014) und Schneider *et al.* (2015) und entsprechend addiert.

Obwohl in den Kristallstrukturen von C1C2 und C1C2-GA keine monovalenten Ionen aufgelöst wurden (Kato *et al.* 2012; Kato, Kamiya *et al.* 2015), wurde im Rahmen von MD-Simulationen von CrChR2 Cl⁻ als Teil eines Wasserclusters nahe des Gegenions D253 identifiziert (Wietek *et al.* 2014). Das Absorptionsspektrum von ReaChR zeigt eine Blauverschiebung um 12 nm bei Erhöhung der Ionenstärke des Puffers (hauptsächlich NaCl) von 2.5 mM auf 164 mM (physiologisch) (*cf.* Abbildung 35A). Die hypsochrome Verschiebung könnte die Bindung eines Cl⁻-Ions innerhalb des Gegenionenkomplexes suggerieren und so die positive RSBH⁺ besser stabilisieren. Die Chloridpumpe HR erfährt bei Bindung eines Cl⁻-Ions eine Verschiebung von 25 nm zu kürzeren Wellenlängen ($\lambda_{\max} = 601 \rightarrow 576$ nm) (Scharf & Engelhard 1994). Ein natives Threonin an Stelle eines der Gegenionen (analog CrChR2-E123T) unterstützt dabei die Bindung (Kolbe *et al.* 2000; Kouyama *et al.* 2010). Um die ca. 15 nm Blauverschiebung der Gegenionenmutante E162T in C1V1 (CrChR2-E123T) im Vergleich zum Wildtyp zu erklären, wurde ein ähnliches Arrangement wie in HR postuliert (Prigge *et al.* 2012).

Zusätzlich vermögen Cl⁻-Ionen in der Doppelgegenionenmutante D85N-D212N von BR (CrChR2-E123N-D253N) deren Rolle zu übernehmen und den Chromophor auf diese Weise zu stabilisieren (Marti, Rösselet *et al.* 1991). Folglich scheint eine Beteiligung von Cl⁻ an der Farbverschiebung in ReaChR möglich.

Alternativ könnte auch ein anderer Protonierungszustand des E123-Homologs in ReaChR (E163) angenommen werden. Im Rahmen von Hybrid-QM/MM-Simulationen an CrChR2 wurden zwei negativ geladene Gegenionen vorhergesagt (Watanabe *et al.* 2013), wessen Neutralisation eine Verschiebung in den roten Spektralbereich um 23 nm (E123Q) bzw. 16 nm (D253N) verursacht (Govorunova *et al.* 2013). Ähnliche bathochrome Verschiebungen wurden auch für Gegenionenmutanten in PsChR2 und C1C2 berichtet (Govorunova *et al.* 2013; Li *et al.* 2014; Ito *et al.* 2014). Ein „protoniertes“ E123-CO₂H könnte demnach die Differenz der Absorptionsspektren zwischen ReaChR und CrChR2-E123-CO₂-T159C-G181S-S256A erklären (Abbildung 56B). Evidenzen für die vorherige Annahme liefern spektroskopische Befunde an ReaChR und deren Gegenionenmutanten. Das Dunkelspektrum (*cf.* Abbildung 41A) sowie das Differenzspektrum des N-Intermediats von E163T (*cf.* Abbildung 42C) sind gegenüber dem WT bei pH 7.4 nahezu nicht rot-verschoben ($\Delta\lambda_{\max} = 1 - 3$ nm). Im homologen CrChR2-E123T ist dagegen nicht nur der Dunkelzustand ($\Delta\lambda_{\max} = 20 - 25$ nm) (Gunaydin *et al.* 2010; Berndt *et al.* 2011), sondern auch die Photozyklusintermediate P₅₀₀ und P₅₂₀ ($\Delta\lambda_{\max}(\Delta\text{Abs}) = 15 - 40$ nm) bathochrom verschoben (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Des Weiteren war die Deprotonierung der RSB in ReaChR, d.h. L→M-Übergang, in der Mutante nur 1.7fach im Vergleich zum WT verlangsamt (*cf.* Abbildung 42D). Beide Beobachtungen suggerieren WT-ähnliche Zustände in E163T und legen ein zumindest partiell nichtionisiertes E163 im WT bei pH 7.4 nahe.

Die Transformation von CrChR2 nach ReaChR geht mit einer sukzessiven Reduktion an Absorptionsfeinstruktur einher (*cf.* Abbildung 56B). Im Allgemeinen impliziert ein feinstrukturiertes Spektrum eine rigide Chromophorkonfiguration innerhalb des Apoproteins mit geringen translatorischen Freiheitsgraden, infolgedessen die vibronisch-gekoppelten elektronischen Übergänge aufgelöst werden (*cf.* Abbildung 25). Im Falle von CrChR2 ließe sich dies zumindest partiell durch die „Verankerung“ der C₁₅=N-Bindung durch die starke ionische Interaktion mit zwei deprotonierten Gegenionen erklären. Im Gegensatz dazu könnte ein Verlust von Feinstruktur und somit ein Zuwachs an Freiheitsgraden in ReaChR mit der schwächeren Fixierung der RSBH⁺ durch nur ein negativ geladenes Gegenion und eine Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden.

Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere Faktoren wie sterische Kontakte, Konformationsänderungen, Distorsionen des Chromophors oder Charge-Transfer-Prozesse zur spektralen Lage des betrachteten ChRs beitragen. So lassen sich zum Beispiel die Blauverschiebungen von ReaChR-E130Q ($\Delta\lambda_{\max} = 14$ nm, Zentrales Tor, 5.8 Å zur RSB) (*cf.* Abbildung 39A) und ReaChR-C168T ($\Delta\lambda_{\max} = 23$ nm, DC-Paar, 3.2 Å zum C₁₂ des Retinals) nicht ohne Weiteres erklären. Die homologen Mutationen auf CrChR2 sind entweder überhaupt nicht verschoben (E90Q) (Ritter *et al.* 2008) oder weisen eine leichte Rotverschiebung (C128T)

des Dunkelspektrums auf (Stehfest *et al.* 2010; Bamann *et al.* 2010). Auch in anderen ChRs wie *CoChR* und *Chronos* (*cf.* Abbildung A 6A, C) führte die C128T-analoge Substitution zu einer bathochromen Verschiebung von 5 - 10 nm, während das Pendant in C1V1-25 quasi nicht verschoben ist ($\Delta\lambda_{\max} \sim 1$ nm) (Prigge 2012). Die Blauverschiebung von *ReaChR*-C168T könnte entweder durch eine bessere Stabilisierung der RSBH⁺ in S₀ aufgrund der polaren Hydroxylgruppe des Threonins oder durch eine negative Beeinflussung der Delokalisation der positiven Ladung in S₁ erklärt werden. In beiden Szenarien würde sich die Energiedifferenz zwischen den elektronischen Niveaus vergrößern, wobei aufgrund der großen Entfernung des Threonins zur RSBH⁺ der zweite Mechanismus realistischer erscheint. Unabhängig von der exakten Ursache ist die Farbverschiebung aber spezifisch für *ReaChR*, denn auch in BR, welches ein natives Threonin an korrespondierender Stelle trägt (I90), wird durch die polare Aminosäure eine Verschiebung zu größeren Wellenlängen vermittelt (Flitsch & Khorana 1989; Perálvarez-Marín *et al.* 2004; Welke *et al.* 2011).

Im geschlossenen Zustand von C1C2 wird der extrazelluläre Halbkanal vom Zentralen Tor durch mehrere Wasserstoffbrücken abgeschnürt (Kato *et al.* 2012). Dem E130-Homolog in *ReaChR* (E90 in *CrChR2*) kommt dabei entscheidende Bedeutung zu. In Computersimulationen an C1C2 wurde gezeigt, dass es durch Beeinträchtigung des Wasserstoffbrückennetzwerks ausgehend vom E130-Homolog – wie vermutlich auch in entsprechenden Mutanten – bereits im unbelichteten Zustand zu einem Wassereinstrom kommt (Takemoto *et al.* 2015). Infolge einer vorzeitigen Wassermigration könnten zum einen Distanzveränderungen innerhalb des Gegenionenkomplexes induziert werden oder Wassermoleküle könnten sich direkt an der elektrostatischen Stabilisierung der RSBH⁺ beteiligen. Alternativ wäre eine Umorientierung von Q130 denkbar. Im Rahmen des EHT-Modells von *CrChR2* beschreibt das homologe E90 nach Deprotonierung eine Auswärtsbewegung und bildet eine Salzbrücke zu K93 (K133 in *ReaChR*). Diese strukturelle Änderung wurde für E90Q zu 70 % bereits für den Dunkelzustand vorhergesagt (Kuhne *et al.* 2015) und könnte auch auf *ReaChR*-E130Q zutreffen (Abbildung 56A, *grau*). Da sich das entsprechende Lysin in unmittelbarer Nähe zu den Gegenionen befindet und deren pK_s-Werte moduliert (Li *et al.* 2014), scheint auch dieser Erklärungsansatz realistisch.

4.4 Protochromismus in Kanalrhodopsinen

Kanalrhodopsine weisen ein unterschiedliches Ausmaß an pH-abhängiger Verschiebung des Dunkelzustands ($\Delta\lambda_{\max} = 0 - 65$ nm) auf (*cf.* Tabelle 4). Dabei lassen sich die Mitglieder der ChR-Familie grob in drei Klassen einteilen: 1) schwach 2) moderat 3) stark pH-abhängig. ChRs wie *CrChR2* (Ritter *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009; Stehfest & Hegemann 2010), *VrChR2* (Kianianmomeni *et al.* 2009), ChR1 aus *C. yellowstonensis* (*CyChR1*) (Hou *et al.* 2012) und *MtChR* (Govorunova *et al.* 2011) können zu der ersten Gruppe gezählt werden und weisen bei Azidifizierung Farbverschiebung von $\Delta\lambda_{\max} \leq 10$ nm auf. In der Klasse der moderat pH-abhängigen ($\Delta\lambda_{\max} < 25$ nm) finden sich neben dem natürlichen *PsChR2* (Govorunova *et al.*

2013) nur Chimären wie C1C2 (Kato *et al.* 2012), V1V2-25 (Ernst *et al.* 2008) und ChR1/2_{2/5} (Tsunoda & Hegemann 2009). Zu den stark pH-abhängigen ChRs ($\Delta\lambda_{\text{max}} > 25 \text{ nm}$) gehören CrChR1 (Berthold *et al.* 2008), VcChR1 (Kianianmomeni *et al.* 2009), CaChR1 (Li *et al.* 2014), Chrimson (Urmann *et al.* 2017; Vierock *et al.* 2017), ReaChR (Teil dieser Arbeit) und einige Hybride aus VcChR1 und VcChR2 (Prigge *et al.* 2012).

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Aminosäure(n) für die pH-getriebenen Farbverschiebungen verantwortlich sein könnten und inwiefern die molekulare Struktur dazu beiträgt. Allgemeine Überlegungen legen eine Zugänglichkeit der protonierbaren Reste von der extrazellulären Seite sowie eine räumliche Nähe zur RSB nahe. Im Rahmen von teils unbeabsichtigten Helix-Chimären-Studien an CrChR1 und CrChR2 (ChR1/2_{2/5} & ChR1/2_{2/5}) sowie VcChR1 und VcChR2 (V1V2-25) wurde die zugrunde liegende(n) Aminosäure(n) in den ersten beiden Helices von CrChR1 verortet (Ernst *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009). Dabei korrelierte der Protochromismus mit dem helikalen Anteil der stark pH-abhängigen ChRs CrChR1 und VcChR1. In CrChR1 wurde Glutamat 87 (H1) als Hauptakteur identifiziert, da die neutralisierte E87Q-Mutante spektral insensitiv für pH-Wert-Änderungen war und das gleiche Maximum in den Aktionsspektren ($\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$) bei pH 4.5 und 7.5 zeigte (Tsunoda & Hegemann 2009). Eine hohe Sequenzkonservierung von E87 in allen stark bis moderat pH-abhängigen ChRs (CrChR1, VcChR1, CaChR1, CjChR1, PsChR2 & Chrimson) legen nahe, dass dieser Rest auch in anderen ChRs an der Farbverschiebung beteiligt sein könnte. Die schwach pH-abhängigen CrChR2 und VcChR2 tragen an dieser Position ein Alanin und MvChR Asparaginsäure. Jedoch kann aufgrund des großen Abstands zur RSB ($\sim 20 \text{ \AA}$) eine direkte Wechselwirkung des Restes mit der RSB ausgeschlossen werden. Es scheint eher wahrscheinlich, dass sekundäre Konformationsänderungen inkl. Beeinflussung von Wassernetzwerken die bathochrome Verschiebung induzieren.

Auf Basis der Kristallstruktur von C1C2 (PDB: 3ug9) ließ sich mit *SWISS-Model* (Biasini *et al.* 2014) ein Strukturmodell von CrChR1 vorhersagen, um vermeintliche Interaktionen zu identifizieren (Abbildung 57B). In räumlicher Nähe zu E87 befinden sich zwei Glutamine (N280 & N283), welche in CrChR1 eine interhelikale Wechselwirkung zwischen H1 und H7 ausbilden und so im geschlossenen Zustand zu einem definierten Abstand der RSBH⁺ und seinen Gegenionen (E123 in H3 & D253 in H7, CrChR2-Nomenklatur) beitragen könnten. Durch pH-abhängige (De-)Protonierung von E87 könnte die Interaktion entsprechend geschwächt bzw. gestärkt werden und der Einfluss von E87 trotz der großen Distanz von ca. 20 Å zur RSB erklärt werden. Eine Positionierung der Gegenionen durch eine distale interhelikale Wechselwirkung wurde auch zur Erklärung der großen hypsochromen Verschiebung der Chrimson-Mutante E139A ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 70 \text{ nm}$, $\sim 10 \text{ \AA}$ zur RSB; E97 in CrChR2) angeführt (Vierock *et al.* 2017).

In C1C2 sowie in ReaChR finden sich an den Positionen der beiden Glutamine ein Glycin (G283 bzw. G284) und ein Serin (S280 bzw. S281) (Abbildung 57A). Trotz eines ähnlichen Abstands des Serins zur Carboxylatgruppe der Glutaminsäure ist eine vergleichbar starke Wechselwirkung eher auszuschließen und der für CrChR1 prognostizierte Mechanismus scheint nicht für die Chimären C1C2 und ReaChR zu gelten. Folglich scheint die (noch existente)

pH-Abhängigkeit der homologen E87Q-Mutation in ReaChR (E88Q) nicht verwunderlich. Auch die Mutation der homologen Position in C1V1-25 (E87Q) veränderte die pH-Abhängigkeit des ChR nicht (Prigge 2012).

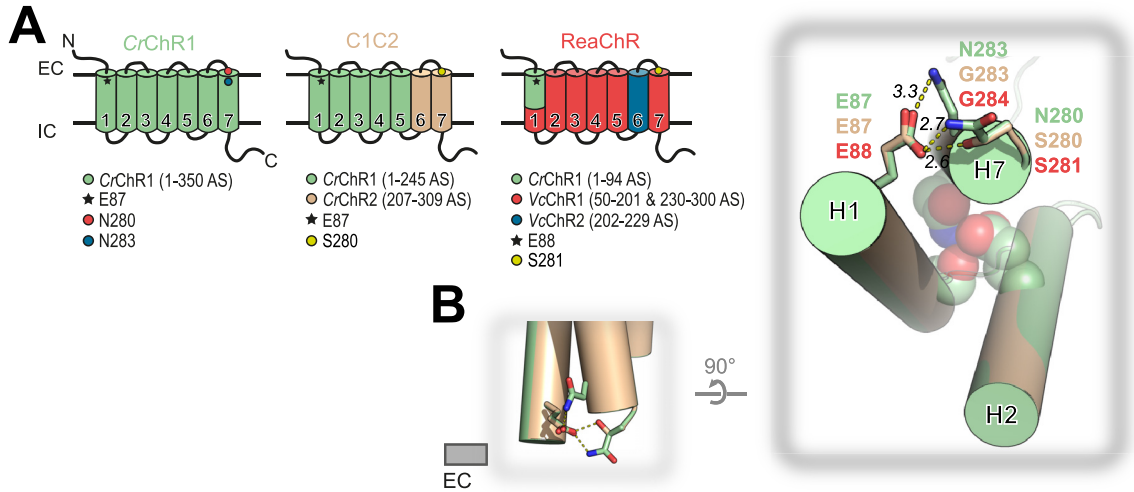


Abbildung 57: Einfluss von E87 auf die pH-Abhängigkeit. A) Skizzierte helikale Zusammensetzung von CrChR1, C1C2 und ReaChR. **B)** Ausschnitt der C1C2-Kristallstruktur (beige, PDB: 3ug9) und eines SWISS-Modells von CrChR1 auf Basis von C1C2 (*grün*) mit Fokus auf der Wechselwirkung der Glutaminsäure 87 (E88 in ReaChR). Abstände in Å. Zentrales Tor ist als Kalottenmodell dargestellt.

Andere Studien brachten die homologen Reste der *proton release group* in BR (E194 & E204; E274 & S284 in C1C2) als Verursacher der pH-abhängigen spektralen Verschiebung ins Gespräch (Hou *et al.* 2012). Während S284 als titrierbare Gruppe ausscheidet, ist E194 allerdings sowohl in den stark pH-abhängigen ChRs wie CrChR1 und VcChR1 als auch in den pH-insensitiven Varianten CrChR2 und VcChR2 konserviert. Es muss an dieser Stelle betont werden, dass sich trotz der Konservierung in beiden Gruppen, dennoch der konkrete pK_s -Wert der E194-Homologen in den einzelnen ChRs stark unterscheiden kann.

Auf Basis von Titrationsexperimenten ($pH \sim 3 - 10$) an dem moderat protochromen P3ChR2 wurden drei Übergänge mit pK_s -Werten von 3.8, 6.6 und ~ 10.5 identifiziert. Die ersten beiden wurden Protonierungsreaktionen der Gegenionen D236 und E106 (D292 & E162 in C1C2) und der alkalische Übergang der Deprotonierung der RSB zugeordnet (Govorunova *et al.* 2013). Analoge pH-Titrations ($pH \sim 2 - 10$) an rekombinantem CaChR1 ergaben pK_s -Konstanten von 2.7, 5.5 und 9, wobei der mittlere Übergang dem D292-homologen Rest (D299 in CaChR1) und der basische dem E162-Homolog (E169 in CaChR1) zugeordnet wurden (Li *et al.* 2014). Die pH-abhängige (De-)Protonierung der Gegenionen als maßgebliche Ursache für den Protochromismus scheint plausibel, dennoch ist der Zusammenhang zur molekularen Architektur noch wenig verstanden.

Im Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss des pH-Werts auf die spektrale Lage des Dunkelzustands von drei verschiedenen ChRs (CrChR2-H134R, C1C2 & ReaChR) untersucht.

Mittels pH-Titrationen von WT und Mutanten wurden einige pK_s -Werte von protonierbaren Aminosäuren bestimmt und sollen im Folgenden bestimmten Resten zugeordnet werden. Die semi-empirische PROPKA-Analyse (H. Li *et al.* 2005; Bas *et al.* 2008; Olsson *et al.* 2011) von C1C2 auf Basis seiner Kristallstruktur lieferte pK_s -Werte von 3.21 und 5.83 für die Gegenionen D292 (D253 in CrChR2) und E162 (E123 in CrChR2) (Kato *et al.* 2012). Da innerhalb der Titrationsexperimente für C1C2 nur pH-Werte ≥ 3.4 appliziert wurden (*cf.* Abbildung 26B), konnte eine Protonierungsreaktion von D293 höchstwahrscheinlich nicht (vollständig) beobachtet werden. Aufgrund der guten Übereinstimmung des ersten experimentell erhobenen pK_s -Wert von 5.05 ± 0.07 bzw. 5.37 ± 0.22 (*cf.* Abbildung 26F) zur PROPKA-Vorhersage für E162 ($pK_s = 5.83$), kann die protochrome Farbverschiebung in C1C2 zum Teil der (De-)Protonierung von E162 zugeordnet werden. Die vermutete Protonierung von E162 verursacht eine bathochrome Verschiebung von 7 nm und liegt damit in guter Übereinstimmung zur neutralisierten E162Q-Mutante, welche eine Farbverschiebung von 9 nm induziert (Ito *et al.* 2014). In Analogie könnte der Übergang bei 4.15 ± 0.13 in CrChR2-H134R dem E162-Homolog in CrChR2 (E123) zugeordnet werden (*cf.* Abbildung 26A), welcher in dem gemessenen pH-Bereich komplett deprotoniert vorliegen würde.

In ReaChR wurden drei pH-induzierte spektrale Übergänge mit pK_s -Werten von 2.8, 7.3 und 8.4 (gemittelt aus beiden Methoden, ohne $pK_s(\text{RSBH}^+)$, *cf.* Abbildung 30B, C) identifiziert. Die protochrome Farbverschiebung im sauren pH-Milieu wurde in Analogie zu C1C2 D293 (D253 in CrChR2) zugeordnet. Da in den Titrationsexperimenten von E163T der neutrale (*cf.* Abbildung 41E) und in E130Q (*cf.* Abbildung 39C) der basische pH-Übergang nicht beobachtet wurden, trägt die (De-)Protonierung beider Reste mit zur Protochromie von ReaChR bei.

Abbildung 58 zeigt eine Zusammenfassung der gemittelten Werte mit Fokus auf dem Gegenionenkomplex. Die schwach ausgeprägte pH-Abhängigkeit ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 6$ nm, pH 3.5 - 11.0) von CrChR2-H134R, welches als Referenz für den WT verwendet wurde, lässt sich mit den niedrigen pK_s -Werten der Gegenionen ($pK_s(\text{E123}) \sim 4.2$; $pK_s(\text{D253}) < 3.5$; gemittelt aus beiden Methoden, *cf.* Abbildung 26) nachvollziehen. Innerhalb der Messreihe von pH ≥ 3.5 blieben beide sauren Aminosäuren (nahezu) quantitativ deprotoniert und es wurden demnach nur sehr geringe protoneninduzierte Rotverschiebungen des Absorptionsmaximums detektiert. Im Gegensatz dazu ist für C1C2 der pK_s -Wert des E123-Homolog (E162) um eine pH-Einheit in den neutralen Bereich ($pK_s(\text{E162}) \sim 5.2$) verschoben, was mit einem stärkeren Ausmaß an pH-Abhängigkeit ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 12$ nm, pH 3.4 - 11.0) korreliert (*cf.* Abbildung 26). Im stark protochromen ReaChR ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 35$ nm, pH 1.6 - 11.2) zeigt das E123-Homolog (E163) sogar erst im neutralen pH-Bereich ($pK_s(\text{E163}) \sim 7.3$) eine entsprechende (De-)Protonierungsreaktion (*cf.* Abbildung 30). Dieser Befund impliziert, dass E163 bei pH 7.4 partiell protoniert ist und somit, wie im vorherigen Abschnitt bereits diskutiert, maßgeblich an der spektralen Lage von ReaChR beteiligt ist. Demzufolge lassen sich auch die hypsochromen Farbverschiebungen der UV-vis-Differenzspektren des K- ($\Delta\lambda_{\text{max}}(\Delta\text{Abs}) = 16$ nm) und des N-Photointermediates bei pH 9 ($\Delta\lambda_{\text{max}}(\Delta\text{Abs}) = 23$ nm) nachvollziehen (*cf.* Abbildung 31D, E). Auch in V1V2-25 erfahren

die beiden protonierten RSB-Spezies P_{500} (K) und P_{510} (N) bei Erhöhung des pH-Werts eine Verschiebung um 15 und 20 nm zu kürzeren Wellenlängen (Ernst *et al.* 2008).

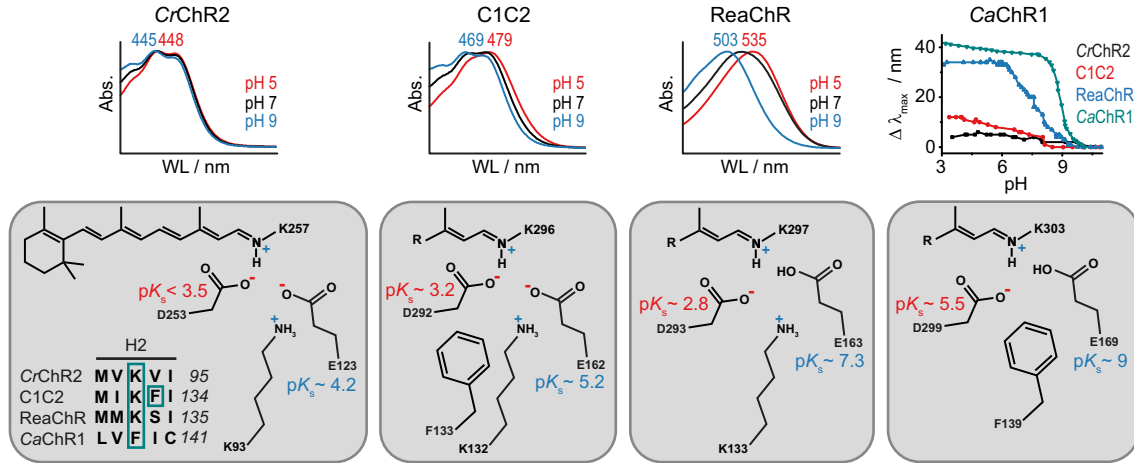


Abbildung 58: Korrelation zwischen der pH-Abhängigkeit und den pK_s -Werten der Gegenionen. Gezeigt sind UV-vis-Spektren von CrChR2-H134R, C1C2 und ReaChR bei drei pH-Werten sowie deren Titrationskurven als Funktion der Verschiebung des Absorptionsmaximums (cf. Abbildung 26 & Abbildung 30). Gezeigte pK_s -Werte sind gemittelt aus beiden Auswertungsmethoden. Vereinfachte Strukturmodelle der Gegenionenkomplexe in vier ChRs. Sequenzvergleich einiger Reste der H2. pH-insensitive ChRs wie CrChR2 besitzen zwei Gegenionen mit sehr kleinen pK_s -Werten und liegen demzufolge in einem großen pH-Bereich deprotoniert vor. Die pK_s -Werte der Gegenionen werden von einem alkalischen Lysin in H2 moduliert. CaChR1 trägt anstelle eines Lysins ein Phenylalanin, welches eine Anhebung beider pK_s -Werte induziert. C1C2 und ReaChR stellen Mischungen aus beidem dar. Zusätzlich spielt der Abstand der einzelnen Reste zur RSBH⁺ eine Rolle. pK_s (D253 in CrChR2) wurde abgeschätzt und pK_s (D292 in C1C2) aus Kato *et al.* (2012). Daten der Titrationskurve und pK_s -Werte von CaChR1 sind entnommen aus Li *et al.* (2014).

Es stellt sich nun die Frage, welche strukturellen und elektrostatischen Begebenheiten die große Variabilität der pK_s -Werte der Gegenionen innerhalb der verschiedenen ChRs erklären könnte. Zum jetzigen Zeitpunkt der Arbeit steht uns jedoch nur die hochaufgelöste Kristallstruktur der C1C2-Chimäre (Kato *et al.* 2012) zur Verfügung, um über vermeintliche Interaktionen zu spekulieren. Der Gegenionenkomplex in C1C2 wird neben den beiden sauren Aminosäuren, der RSBH⁺ und einem Wassermolekül zusätzlich von einem alkalischen Lysin in H2 (K132) gebildet. Durch Deprotonierung beider Gegenionen könnte die positive Ladung an der RSBH⁺ und dem K132 kompensiert werden, ein Quadrupol würde entstehen. Das alkalische Lysin ist ebenfalls in CrChR2 (K93) und in ReaChR (K133) konserviert, jedoch in manchen ChRs wie CaChR1 (F139) und Chrimson (F135) durch ein Phenylalanin ersetzt. Li *et al.* (2014) postulierten, dass die elektrostatische Interaktion mit dem basischen Lysin die pK_s -Werte der Gegenionen modulieren würde. So führt die Anwesenheit eines aromatischen Restes an homologer Position in Chrimson zu einer Anhebung der pK_s -Werte der Gegenionen in den alkalischen Bereich (Vierock *et al.* 2017). Ein protoniertes E169 in CaChR1 bei pH 7.0 wurde auch in Raman- und FTIR-Messungen verifiziert (Ogren *et al.* 2014; Ogren, Yi, Mamaev, Li, Lugtenburg *et al.* 2015; Ogren, Yi, Mamaev, Li, Spudich *et al.* 2015). C1C2 trägt in unmittelbarer Nähe zum korrespondierenden Lysin ebenfalls ein Phenylalanin (F133), welches evtl. die

Anhebung des pK_s -Werts des E162 um eine pH-Einheit gegenüber *CrChR2* erklären könnte (cf. Abbildung 26).

Des Weiteren spielen die Abstände der Gegenionen zur $RSBH^+$ eine entscheidende Rolle. In C1C2 ist das D292 3.0 Å von der RSB entfernt und damit 0.4 Å näher als E162 (Kato *et al.* 2012). Das selbige Arrangement wird für *CrChR2* angenommen. Für ReaChR sowie CaChR1 (Li *et al.* 2014) haben sich jedoch Evidenzen angesammelt, welche suggerieren, dass E163 näher zur RSB positioniert ist. Zum einen ist der pK_s -Wert der $RSBH^+$ in ReaChR-E163T stärker zu kleineren pH-Werten verschoben als in -D293N (cf. Abbildung 41E), und zum anderen impliziert der starke Einfluss von E163 auf die Cofaktor-Distorsion eine unmittelbare räumliche Nähe (cf. Abbildung 45). Zusätzlich könnte die hypsochrome Verschiebung des N-Zustands in D293N (cf. Abbildung 42C) durch ein näheres, unter diesen Umständen deprotoniertes, E163 erklärt werden.

Nichtsdestotrotz ist die Annahme eines C1C2-analogen molekularen Arrangements innerhalb des Gegenionenkomplexes von ReaChR, ohne die Kenntnis der exakten Struktur spekulativ. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, hat E130 (E90 in *CrChR2*) einen Einfluss auf die Dunkelabsorption. Des Weiteren ist es mit an der pH-Abhängigkeit von ReaChR beteiligt (cf. Abbildung 39). Beide Beobachtungen suggerieren eine alternative Architektur der strukturellen Einheit (cf. Abbildung 56A). Auf Basis von Computersimulationen wurde für *CrChR2* eine Wechselwirkung zwischen E90 und K93 vorhergesagt (Kuhne *et al.* 2015; Richards & Dempski 2017). Falls eine ähnliche Interaktion für ReaChR im Dunkelizustand bestehen würde, könnte auch E130 einen Einfluss auf die pK_s -Modulation nehmen und so die große hypsochrome Verschiebung der E130Q-Mutante ($\Delta\lambda_{\max} = 14$ nm) und die pH-Abhängigkeit (mit)erklären.

Abschließend lässt sich die Beteiligung von einwertigen Ionen auf den Protonierungszustand der Gegenionen nicht ausschließen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wird aufgrund von spektroskopischen Experimenten (cf. Abbildung 35) die Bindung eines Cl^- -Ions nahe der RSB vermutet. Ein gebundenes Cl^- innerhalb des Gegenionenkomplexes könnte die „fehlende“ Ladung des protonierten E163 beisteuern und so das Quadrupol aufrechterhalten. Ein ähnliches Arrangement kommt nativ in der Chloridpumpe HR vor (Kolbe *et al.* 2000; Kouyama *et al.* 2010) und wurde auch für eine Gegenionenmutante der ChR-Chimäre C1V1 postuliert (Prigge *et al.* 2012).

In motilen Algen, zumindest in *C. reinhardtii* und *V. carteri*, kommt meist ein Paar aus einem stark (*CrChR1* & *VcChR1*) und einem weniger pH-sensitiven ChR (*CrChR2* & *VcChR2*) vor, wobei das bathochrom verschobene zumeist als ChR1 bezeichnet wird. Generell wurde Protochromismus als molekularer Schalter zwischen positiver und negativer Phototaxis angenommen, um auf Folgen von pH-Änderungen der Umgebung und/oder des Zellinneren durch Photosynthese zu reagieren (Berthold *et al.* 2008; Kianianmomeni *et al.* 2009). Auf Basis der vorherigen Resultate kann der E123-homologen Aminosäure dabei eine entscheidende Funktion beigelegt werden.

4.5 Photozyklus und Protontransferreaktionen in ReaChR

Entgegen früheren funktionellen Studien (Lin *et al.* 2013) demonstriert ReaChR ein rhodopsintypisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum des Chromophorpeaks im grünen Spektralbereich ($\lambda_{\text{max}}(\text{IDA}) = 527 \text{ nm}$) (*cf.* Abbildung 30A). Nach Laseranregung nahe des Absorptionsmaximums ($\lambda_{\text{Exz}} = 530 \text{ nm}$) durchläuft ReaChR bei pH 7.4 einen Photozyklus mit fünf spektralen Intermediaten K_{app} , L_{app} , M_{app} , N_{app} und O_{app} . Da es sich, wie im nächsten Kapitel ausführlicher diskutiert (*cf.* Kapitel 4.6), höchstwahrscheinlich um die Photoprodukte aus zwei Dunkelizustandsisomeren handelt, werden bei Grünbelichtung apparente Intermediate detektiert. Die Bildung des frühen rot-verschobenen K_{app} -Intermediats ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$, Abbildung 59A) ist bei Raumtemperatur zwar schneller als die Zeitauflösung ($< 40 \text{ ns}$) (*cf.* Abbildung 31), lässt sich unter kryostatischen Bedingungen (80 - 200 K) jedoch auflösen (*cf.* Abbildung 43B). Bei 150 K ist das Intermediat maximal akkumuliert und zeigt im korrespondierenden FTIR-Spektrum neben der Isomerisierung von *all-trans* nach *13-cis* nur geringe Proteinbewegungen bzw. Hydratisierungsänderungen an (*cf.* Abbildung 43A). Dieser Befund deckt sich mit Kristallstrukturen von K-Intermediaten in BR, welche ebenfalls keine signifikanten globalen Strukturänderungen gegenüber dem Dunkelizustand zeigten (Edman *et al.* 1999; Schobert *et al.* 2002; Matsui *et al.* 2002). Des Weiteren impliziert eine markante HOOP-Bande im FTIR-Spektrum von ReaChR (*cf.* Abbildung 43A) eine starke Distorsion des Cofaktors (Abbildung 59B), welche primär der Konservierung der Photoenergie dient (Bondar *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2014).

Die gespeicherte Energie wird im anschließenden $K_{\text{app}} \rightarrow L_{\text{app}}$ -Übergang durch Relaxation des Chromophors an die Proteinumgebung abgegeben und große Konformationsänderungen sind zu beobachten (*cf.* Abbildung 43A). Diese könnten im Kontext der ChRs mit einer Kanalvoröffnung (*pre-gating*) korrelieren. Ein homologes L-Intermediat ist für CrChR2 und CaChR1 unbekannt (Ritter *et al.* 2008; Bamann *et al.* 2008; Sineshchekov *et al.* 2013), wurde aber kürzlich für PsChR2 (Szundi, Li *et al.* 2015) und die anionenleitenden AChRs aus *Proteomonas sulcata* (PsACR1) (*cf.* Abbildung A 7) (Wietek *et al.* 2016; Hontani, Broser *et al.* 2017) und *Guillardia theta* (GtACR1) (Sineshchekov *et al.* 2016) identifiziert. Der L_{app} -Zustand ($\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$) (Abbildung 59A) steht in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der deprotonierten RSB-Spezies (M_{app}) (*cf.* Abbildung 31). Nach dem „Prinzip des kleinsten Zwangs“ (Le Chatelier) würde sich das Gleichgewicht durch Verarmung eines der Produkte (Protonen) bei pH 9 in Richtung der Eduktseite (L-Zustand) verschieben und *vice versa* bei pH 5. Ein ähnliches Gleichgewicht wurde für P₃₉₀ (M) und P₅₂₀ (N) in V1V2-25, CaChR1 und CrChR2-C128T postuliert. Während P₃₉₀ bzw. M unter sauren Bedingungen in V1V2-25 und CaChR1 (Ernst *et al.* 2008; Li *et al.* 2014) sowie PsACR1 (*cf.* Abbildung A 7) kaum bis überhaupt nicht zu beobachten ist, wird das deprotonierte Intermediat in der langsamen Mutante CrChR2-C128T mit steigendem pH auf Kosten von P₅₂₀ gebildet (Bamann *et al.* 2010). Auch für C1C2 ist das homologe M-Intermediat bei pH 10 deutlicher zu beobachten als bei pH 8 (Hontani, Marazzi *et al.* 2017).

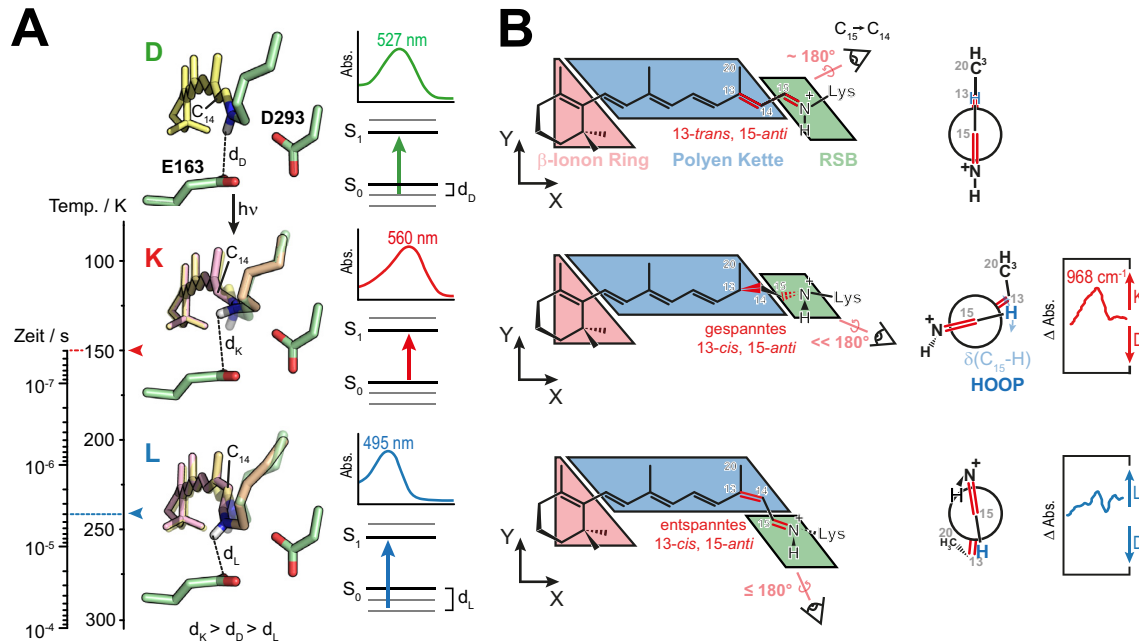


Abbildung 59: Frühe Photozyklusintermediate von ReaChR. **A)** Modelle des Dunkel- (C1C2, PDB: 3ug9), K- (BR, PDB: 1O0A) und L-Zustands (BR, PDB: 1M0K) von ReaChR mit Fokus auf deren Gegenionenkomplex. Strukturen der Intermediate mit inverser Isomerisierungsrichtung wurden mit PyMOL modelliert. (Berechnete) Absorptionsspektren sind gezeigt (cf. Abbildung 31F). Einfluss des Abstands der Gegenionen zur RSBH⁺ auf die Stabilisierung des elektronischen Grundzustands (S_0). Zeitpunkt bzw. Temperatur der maximalen Population ist skizziert (Pfeile). (cf. Abbildung 31B & Abbildung 43) **B)** Geometrie des Retinal-Chromophors in den einzelnen Intermediate in der XY-Ebene (*links*) sowie in Newman-Projektion (*Mitte*) mit Blick auf die C₁₅-C₁₄-Einfachbindung. Verdrehter Cofaktor im K-Zustand zeigt u.a. eine C₁₅-H-Deformationsschwingung (HOOP, engl. *hydrogen-out-of-plane*) in den FTIR-Differenzspektren (*rechts*). Die HOOP-Bande verliert infolge der Relaxation des Retinal-Moleküls im L-Zustand an Intensität. Ausschnitt der Spektren aus Abbildung 43A.

Die hypsochrome Farbverschiebung im L_{app} -Zustand lässt sich durch eine bessere Stabilisierung des elektronischen Grundzustands gegenüber D_{app} und K_{app} erklären, da im Zuge der Entspannung des Chromophors die RSBH⁺ näher zu den Gegenionen rückt (Abbildung 59A). Während L_{app} in der Gegenionenmutante E163T gegenüber dem WT ca. 1.7fach länger populiert wird, ist der blau-verschobene Zustand in D293N sogar mehr als 20 Mal länger existent (cf. Abbildung 42D). Dieser Prozess korreliert mit der verzögerten Bildung des M-Intermediats, d.h. der Deprotonierung der RSB. Ähnliche Effekte wurden auch für CrChR2-E123T und -D253N beobachtet (Lórenz-Fonfría *et al.* 2013; Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015). Aufgrund der stark retardierten Bildungskinetik des M_{app} -Intermediats in der Gegenionenmutante D293N (cf. Abbildung 42B) wurde D293 als Protonakzeptors postuliert. Diese Zuordnung wird durch elektrophysiologische Messungen unterstützt, in welchen für ReaChR-D293N nur sehr geringe Kanalströme detektiert wurden (Kaufmann *et al.* 2017). Der homologe Rest wurde ebenfalls für CrChR2 und C1C2 als primärer H⁺-Akzeptor vorgeschlagen (Kato *et al.* 2012; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013).

Im nachfolgenden spektralen Übergang von $M_{app} \rightarrow N_{app}$ erfolgt die Reprotonierung der RSB, welche für CrChR2-H134R, C1C2 und C1C2-E129A mit der Bildung einer rot-verschobenen Spezies (P_{520}) einhergeht (cf. Abbildung 25C, D & Abbildung A 4). Im

Gegensatz dazu ist in ReaChR unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) das reprotonierte N ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) vom Dunkelzustand ($\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$) überlagert und demzufolge im Differenzspektrum (Licht minus Dunkel) nicht als positives Signal auszumachen (cf. Abbildung 31B). Jedoch wird bei pH-Wert-Änderungen (pH 5 & 9) (cf. Abbildung 31A, C) oder Mutagenese (E130Q, C168T & D196N) (cf. Abbildung 36, Abbildung 38A & Abbildung 39A) der Dunkelzustand verschoben bzw. die Halbwertsbreite des Chromophors reduziert (E163T & D293N) (cf. Abbildung 41A), infolgedessen N_{app} als rote Flanke beobachtet werden kann (cf. Abbildung 36, Abbildung 38C, Abbildung 40A & Abbildung 42A, B).

Die Frage des konkreten Protondonors konnte im Rahmen der Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Während für CrChR2 D156 als Protondonor vorgeschlagen wurde (Lórenzfónfría *et al.* 2013), scheint die homologe Aminosäure in ReaChR (D196) nicht der Protondonor zu sein. Obwohl eine moderate Verlangsamung des Photozyklus (30 - 40fach) gegenüber dem WT zu beobachten ist (cf. Abbildung 38D), bleibt der Effekt deutlich hinter Mutationen des homologen D156 in CrChR2 zurück (200 - 15.000fach) (cf. Tabelle 2) (Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011; Berndt 2011; Dawydow *et al.* 2014). Dies könnte zwar mit dem nativen C199 (T159 in CrChR2) begründet werden, welches einer weiteren Retardierung des Photozyklus entgegenwirkt (Prigge *et al.* 2012; Prigge 2012), jedoch wäre bei Neutralisation des hypothetischen Protondonors eigentlich ein drastischerer Effekt zu erwarten. Weiterhin spricht der stark ausgeprägte reprotonierte N-Zustand in D196N (cf. Abbildung 38C) gegen die Funktion von D196 als H^+ -Donor. In CrChR2-D156A war kaum P_{520} (N) zu identifizieren (Bamann *et al.* 2010). Als weiteres Gegenargument lässt sich die Insensitivität der Infrarotbande von D196 gegenüber H/D-Austausch anführen (cf. Abbildung 46A), welche im Falle eines austauschbaren Protons eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen erfahren würde. In dem nahverwandten C1V1-25 führen die analogen Substitutionen D195A und D195N zu einer Beschleunigung des Kanalschlusses (Prigge *et al.* 2012; Prigge 2012). Abschließend sollte darauf hingewiesen werden, dass diese Asparaginsäure in manchen ChRs wie Chrimson (C198), ChR1 aus *C. bilatus*-A (C197, Protein-ID: AHH02128) sowie ChR2 aus *Pleodorina starii* (S114, GenBank: AEY68813) nicht konserviert ist (Zhang *et al.* 2011; Govorunova *et al.* 2013; Klapoetke *et al.* 2014), weswegen eine funktionelle Konservierung in ReaChR weniger wahrscheinlich erscheint.

Auch die Funktion von E130 (E90 in CrChR2) als Protondonor in ReaChR wird ausgeschlossen. Im Rahmen der Photoaktivierung erfährt es nach einer Wasserstoffbrückenänderung, d.h. Reduktion der H-Brücken zu N298 von zwei auf eins, im $D_{\text{app}} \rightarrow K_{\text{app}}$ -Übergang eine Deprotonierung im photostationären Zustand (cf. Abbildung 46A). In Analogie zu dem für CrChR2 postulierten *E90-Helix2-Tilt*-Modell, ist die Deprotonierung die Folge einer Auswärtsbewegung der sauren Aminosäure, welche schlussendlich die Kanalvoröffnung induziert (Kuhne *et al.* 2015). Im Vergleich zum WT ist die Deprotonierung der RSB sowie der Zerfall des N- und O-Intermediats in E130Q beschleunigt (Abbildung 40B). Ersteres wurde auch für homologe Aminosäuresubstitutionen in CrChR2 beobachtet (Ritter *et al.* 2008; Ruffert *et al.* 2011) und mit einer Voröffnung des Kanals infolge der Auswärtsorientierung des eingebrachten Glutamins begründet (Kuhne *et al.* 2015). Mithilfe eines Doppelbelichtungsprotokoll an ReaChR konnte gezeigt werden, dass E130 bereits im M-Zustand

deprotoniert vorliegt und somit als Protondonor für die RSB ausscheidet (Kaufmann *et al.* 2017). Demzufolge wäre eine Reprotonierung über ein Wassermolekül der ionenleitenden Pore denkbar, da im Zuge der Kanal(vor)öffnung eine große Anzahl dieser in der Nähe der RSB vorhanden sein müsste.

Via zeitaufgelöster FTIR-Messungen (*rapid-scan*) wurde im reprotonierten N_{app} -Zustand von ReaChR die Bildung einer starken Wasserstoffbrücke ausgehend von einem Cystein beobachtet (*cf.* Abbildung 47B). In C1C2 (Ito *et al.* 2014) und CaChR1 (Lórenz-Fonfría *et al.* 2014) wurde eine homologe Thiol-Schwingung dem C168-analogen Cystein innerhalb des DC-Paars (C128, H3 & D156, H4 in CrChR2; *cf.* Abbildung 4D) zugeordnet. Da in elektrophysiologischen Inaktivierungsexperimenten dem reprotonierten N-Zustand ein leitender Charakter zugeschrieben wurde (Krause *et al.* 2017), wäre eine Stabilisierung der offenen Kanalkonfiguration durch eine gebildete intra- oder interhelikale H-Brücke vorstellbar. Auch wenn die großen Abstände $> 4 \text{ \AA}$ zwischen dem homologen C168 und D196 in der C1C2-Kristallstruktur eher gegen eine direkte Wechselwirkung sprechen (Kato *et al.* 2012), wurde in Computersimulationen eine über ein Wassermolekül medierte interhelikale (Watanabe *et al.* 2013) bzw. eine intrahelikale (H3) Interaktion zum Sauerstoffatom der Amidbindung eines Tryptophans (W164 in ReaChR) postuliert (Watanabe *et al.* 2012).

Für das langsame ReaChR-C168S konnte eine Konversion von M_{app} zum Dunkelzustand durch UV-Belichtung (400 nm) katalysiert werden (*cf.* Abbildung 37E), eine Eigenschaft, welche auch für CrChR2-basierte SFO-Mutanten beobachtet wurde (Stehfest *et al.* 2010; Bamann *et al.* 2010; Yizhar *et al.* 2011). Eine biphasische Zerfallskinetik des deprotonierten Intermediats in ReaChR, besonders in den Gegenionenmutanten E163T und D293N, deutete auf die Existenz zweier M-Zustände ($M_{1/app}$ & $M_{2/app}$) hin. Während der Hauptteil von M_{app} , vermutlich $M_{1/app}$, im Millisekundenbereich in das reprotonierte N_{app} überging, verblieb ein kleinerer Anteil in deprotonierter Form ($M_{2/app}$) und ging im Sekundenbereich direkt in den Dunkelzustand über (*cf.* Abbildung 42A, B). Es bleibt zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, ob $M_{2/app}$ nur die residuale Fraktion von M_{app} darstellt, welche nicht zum N_{app} reprotoniert wurde, oder ob es eventuell aus $M_{1/app}$ gebildet wird. Grundsätzlich ist die Untersuchung von mehreren UV-Spezies mit deprotonierter RSB aufgrund ihrer kleinen spektralen Separation ($\Delta\lambda_{max} \leq 10 \text{ nm}$) (Luck & Hegemann 2017) nicht trivial. Nichtsdestotrotz lässt sich neben dem Hauptphotozyklus ($M_{1/app} \rightarrow N_{app} \rightarrow O_{app} \rightarrow D_{app}$) auch ein Seitenarm ($M_{2/app} \rightarrow D_{app}$) für ReaChR beobachten, dessen Anteil für jede Mutante unterschiedlich stark ausgeprägt war. Im Rahmen von weiteren FTIR-Experimenten wurde der thermische $M_{app} \rightarrow D_{app}$ -Übergang verifiziert und das von der RSB protonierte D293 als Protondonor im Seitenweg ausgemacht (Kaufmann *et al.* 2017). Ein analoger $P_{390} \rightarrow D_{470}$ -Übergang wurde auch für einige langsame Mutanten (C128A, C128T & D156A) von CrChR2 beschrieben (Bamann *et al.* 2010) und könnte daher in ChRs eine funktionelle Relevanz innehaben. Da in dem Seitenarm der mutmaßlich leitende N-Zustand (Krause *et al.* 2017) nicht populiert wird, würde es zu keinem produktiven Kationentransport kommen. Infolgedessen wäre die Abzweigung unter permanenter Belichtung eine Möglichkeit einer vollständigen Depolarisation der Zellmembran in Algen entgegenzuwirken.

Unter Langzeitbelichtung (60 s, 530 nm) wird in der C168S-Mutante neben I_{app} , M_{app} und N_{app} auch ein sehr langlebiges $P_{420/460}$ -Intermediat angereichert (*cf.* Abbildung 37B), welches thermisch innerhalb von Stunden bzw. Tagen nicht in den Dunkelzustand zurückkehrt. Erst durch UV-Illumination (400 nm, 60 s) konnte $P_{420/460}$ vollständig in D bzw. DA_{app} überführt werden (*cf.* Abbildung 37D). In Analogie zu CrChR2-C128T (Stehfest *et al.* 2010) wurde $P_{420/460}$ einem Photoprodukt außerhalb des normalen Photozyklus zugeordnet.

4.6 Lichtadaptation und Grundzustandsheterogenität in ReaChR

Nach anfänglicher Belichtung (530 nm, 60 s) etabliert sich innerhalb einiger Minuten der apparente Dunkelzustand (DA_{app}), welcher gegenüber dem initialen Dunkelzustand (IDA) um ca. 3 - 6 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist ($\lambda_{max}(DA_{app}) = 521 - 524$ nm) (*cf.* Abbildung 32C). Die beobachtete Farbverschiebung wird als Lichtadaptation bezeichnet und basiert höchstwahrscheinlich auf Änderungen des Isomerenverhältnisses des Retinal-Cofaktors, welche auch in anderen mikrobiellen Rhodopsinen wie BR (Smith *et al.* 1984; Harbison *et al.* 1984) und ASR (Vogelely 2004) auftreten. Die Kurvenanpassung der Chromophorbande des DA_{app} legte nahe, dass DA_{app} aus einer rot- ($\lambda_{max} \sim 540$ nm, D) und einer blau-verschobenen Komponente ($\lambda_{max} \sim 500$ nm, D') zusammengesetzt ist (*cf.* Abbildung 32H), welche den beiden Hauptisomeren 13-*trans*, 15-*anti* (D) und 13-*cis*, 15-*syn* (D') entsprechen könnten. Die spektrale Separation der beiden Isomere ($\Delta\lambda_{max} \sim 40$ nm) würde zwischen Referenzwerten von BR ($\Delta\lambda_{max} = 20$ nm; BR₅₆₈ & BR₅₄₈) (Smith *et al.* 1984; Harbison *et al.* 1984) und CaChR1 ($\Delta\lambda_{max} = 60$ nm; D₅₄₀ & D₄₈₀) liegen (Stensitzki *et al.* 2015). Retinal-Extraktionsexperimente des DA_{app} ergaben ein Isomerenverhältnis von all-*trans*:13-*cis* von 78:22 (*cf.* Abbildung 32I) und liegen damit in guter Übereinstimmung zu anderen ChRs (*cf.* Tabelle 3) (Kirsch 2007; Nack *et al.* 2009; Stehfest & Hegemann 2010; Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014).

Um eine Grundzustandsheterogenität und gewisse kinetische sowie spektrale Unterschiede für ReaChR zu untersuchen, wurde der Photorezeptor in unabhängigen Messungen in seiner blauen ($\lambda_{Exz} = 450$ nm) und in seiner roten Flanke ($\lambda_{Exz} = 600$ nm) angeregt (Abbildung 60) und Absorptionsänderungen zwischen 40 ns und 10 s detektiert. Der rotlichtinduzierte Photozyklus (*cf.* Abbildung 34C) entspricht qualitativ der Reaktionssequenz nach grüner Illumination, dennoch sind die Kinetiken der spektralen Übergänge deutlich verlangsamt. Im Gegensatz dazu ist der Photozyklus nach blauer Laseranregung (*cf.* Abbildung 34A) beschleunigt und zeigt kein korrespondierendes L-Intermediat. Dieser Befund stellt ein Novum gegenüber CrChR1 und CrChR2 (*single-turnover*-Bedingungen) dar, in welchem keine Wellenlängenabhängigkeit des Photozyklus berichtet wurde. Weder in ultraschnellen UV-vis-Messungen ($\lambda_{Exz} = 420$ vs. 482 nm) von CrChR2 (Verhoefen *et al.* 2010) noch in transienten UV-vis-Messungen der zugrunde liegenden SFO-Mutanten ($\lambda_{Exz} = 439, 456$ vs. 477 nm) (Bamann *et al.* 2010) wurde ein entsprechender Unterschied festgestellt. Auch in

CrChR1 waren die Kinetiken der Kanalöffnung und des Kanalschlusses unabhängig vom eingestrahlten Laserpuls ($\lambda_{\text{Exz}} = 421 - 575 \text{ nm}$), lediglich die Amplitude war reduziert je weiter die Anregungswellenlänge vom Absorptionsmaximum entfernt lag (Berthold *et al.* 2008; Tsunoda & Hegemann 2009). Die zitierten Studien resümierten einen homogenen Grundzustand, obwohl Retinal-Extraktionsexperimente und Raman-Messungen an CrChR2 einen Anteil von 30 % 13-*cis*-Retinal im Dunkelzustand bilanzierten (Nack *et al.* 2009). Während der all-*trans*-Dunkelzustand von CrChR2 bei $\lambda_{\text{max}} = 470$ bzw. 480 nm absorbiert, wurde dem 13-*cis*, 15-*syn*-Pendant ein Absorptionsmaximum von 460 bzw. 470 nm zugewiesen, d.h. nur 10 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben (Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* 2015; Bruun *et al.* 2015). Es stellt sich also die Frage, ob die verwendeten Methoden imstande sind, die eventuell nur marginalen Unterschiede der beiden Zyklen und großen Überlagerungen entsprechend aufzulösen. Im Falle von CaChR1 (Stensitzki *et al.* 2015), (Cs)Chrimson (*cf.* Abbildung A 9) (Urmann *et al.* 2017) und ReaChR, in welchen die beiden vermuteten Dunkelzustände spektral deutlich voneinander getrennt erscheinen ($\Delta\lambda_{\text{max}} \geq 40 \text{ nm}$), wäre eine gezielte Anregung einer der beiden Dunkelzustände realistisch.

Auf Basis der Gauß-Fits (*cf.* Abbildung 32H) und der wellenlängenabhängigen transienten UV-vis-Spektroskopie (*cf.* Abbildung 34) kann spekuliert werden, dass der langsamere Photozyklus nach Laseranregung mit 600 nm in ReaChR primär aus dem 13-*trans*, 15-*anti*-Dunkelzustand ($\lambda_{\text{max}} \sim 540 \text{ nm}$, D) resultiert. Da im Zuge der Isomerisierung und Reisomerisierung die Konfiguration der C₁₅=N-Bindung konserviert bleibt, d.h. *anti*, wird diese Reaktionskaskade als *anti*-Zyklus bezeichnet. *Vice versa* erscheint die Zuordnung der Photochemie nach blauer Belichtung zum 13-*cis*, 15-*syn*-Isomer ($\lambda_{\text{max}} \sim 500 \text{ nm}$, D') und dessen schnellerem *syn*-Zyklus plausibel. Es soll an dieser Stelle betont werden, dass die extrahierten Kinetiken und Spektren dennoch einen nicht unerheblichen Anteil des jeweiligen anderen Zyklus enthalten, da die beiden Dunkelzustände höchstwahrscheinlich überlappen, vor allem im blauen Spektralbereich, und dadurch simultan angeregt werden könnten. Eine ähnliche Problematik wurde auch für CaChR1 thematisiert (Stensitzki *et al.* 2015).

Rajasethupathy *et al.* (2015) berichteten eine Kanalschlusskinetik von $\tau_{\text{off}} = 682 \pm 86 \text{ ms}$ für ReaChR, welche im Vergleich zu unseren Messungen ($\tau_{\text{off}} = 132 - 181 \text{ ms}$, $\lambda_{\text{Exz}} = 530 \text{ nm}$) (Krause *et al.* 2017; Kaufmann *et al.* 2017) deutlich langsamer ausfällt. Auf Basis der vorherigen Resultate könnte der retardierte Kanalschluss in der zitierten Quelle durch eine längerwelligere Anregung $\geq 600 \text{ nm}$ und einen höheren Anteil des leitenden Zustands des *anti*-Zyklus zum Kanalstrom erklärt werden. Lórenz-Fonfría, Schultz *et al.* (2015) wiesen dem *syn*-Zyklus ebenfalls eine schnellere Durchlaufzeit (1 ms) in CrChR2 (E123T) zu, hielten jedoch den letztgenannten Zyklus aufgrund der schnellen Kinetik wenig relevant für die Kanalfunktion. Ähnlich äußerten sich Stensitzki *et al.* (2015) über CaChR1. Diese Äußerungen stehen allerdings im Kontrast zu einigen elektrophysiologischen (Hegemann *et al.* 2005; Nikolic *et al.* 2009) und spektroskopischen Zwei-Zyklen-Modellen mit jeweils einem leitenden Zustand (Stehfest & Hegemann 2010; Ritter *et al.* 2013; Bruun *et al.* 2015; Szundi, Li *et al.* 2015; Szundi, Bogomolni *et al.* 2015) sowie zu unseren elektrophysiologischen Daten zu ReaChR (Krause *et al.* 2017). Nur mit einem Modell,

welches neben zwei Dunkelzuständen auch zwei leitende Zustände beinhaltet, lässt sich die Inaktivierung des Kanalstroms unter Dauerlicht, die biphasische Abklingkinetik sowie die retardierte Rückkehr des transienten Stroms erklären (Hegemann *et al.* 2005; Nikolic *et al.* 2009). Die beiden offenen Zustände unterscheiden sich bezüglich der Ionenselektivität (Berndt *et al.* 2010; Schneider *et al.* 2013) und der Lebenszeit, sowie möglicherweise in der Quantenausbeute der Photoaktivierung, aus der sie hervorgehen (Hegemann *et al.* 2005; Nikolic *et al.* 2009).

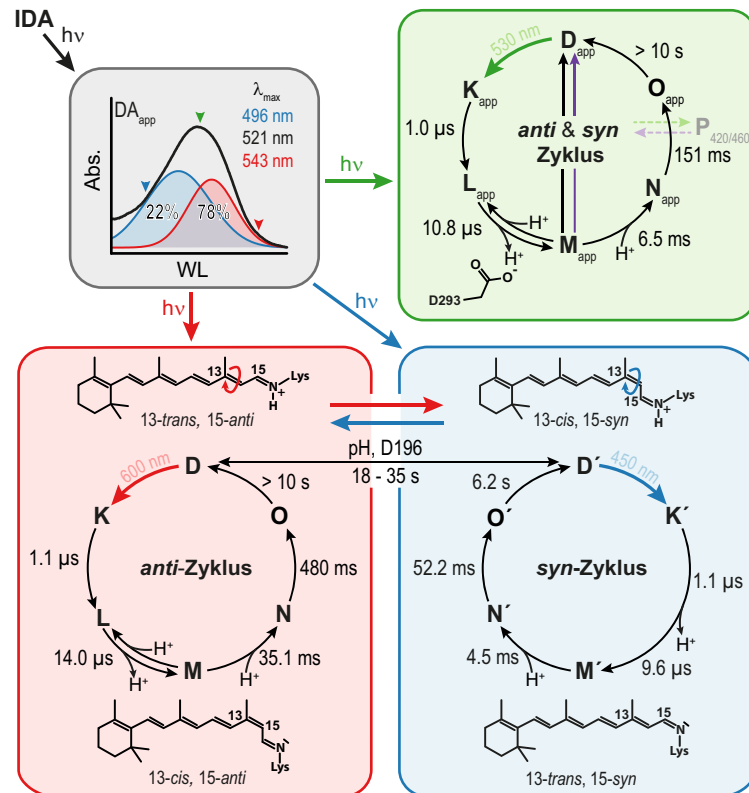


Abbildung 60: Photozyklus, Protonentransferreaktionen und Lichtadaptation in ReaChR. Nach Belichtung des initialen Dunkelzustands (IDA, Aufreinigung unter schwachem Hintergrundlicht $\lambda > 600$ nm) und anschließender Dunkelphase wird der apparente Dunkelzustand (DA_{app}) gebildet. DA_{app} besteht aus den beiden Dunkelzuständen D und D', welchen die beiden Hauptisomere des Retinals, 13-*trans*, 15-*anti* (D, ~80 %, λ_{max} ~540 nm) und 13-*cis*, 15-*syn* (D', ~20 %, λ_{max} ~500 nm), zugrunde gelegt werden könnten. Je nach Belichtungswellenlänge (Pfeile) werden unterschiedliche Anteile von D und D' angeregt und die induzierten Photozyklen überlagern. Neben der verschobenen Absorption des Dunkelzustands unterscheidet sich der von D ausgehende Photozyklus (*anti*-Zyklus) gegenüber seinem *syn*-Pendant in seiner spektralen Zusammensetzung (kein L im *syn*-Zyklus) und in den Kinetiken. Die Equilibrierung von D und D' wird von den Belichtungsbedingungen, dem pH und D196 (DC-Paar, D156 in CrChR2) beeinflusst. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur ein M-Zustand dargestellt.

Aufgrund der vermuteten Grundzustandsheterogenität in ReaChR und der spektralen Überlappung beider Dunkelzustände stellt der Photozyklus nach Grünbelichtung (*cf.* Kapitel 4.5) eine Mischung des *anti*- und des *syn*-Zyklus dar. Für rekombinantes P₃ChR2 wurden die laserinduzierten Absorptionsänderungen ebenfalls mittels zwei paralleler unabhängiger Zyklen beschrieben, wobei 70 % der angeregten Proteine Zyklus 1 und 30 % Zyklus 2 durchliefen (Szundi, Li *et al.* 2015). Obwohl sich die Verteilung zuverlässig mit Isomerenverhältnissen in

CrChR2 (Nack *et al.* 2009), *CrChR2-C128T* (Stehfest *et al.* 2010), *CaChR1* (Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014) und *PsChR2* (Govorunova *et al.* 2013) korrelieren lässt, müssen weitere Faktoren wie z.B. Retinal-Protein-Wechselwirkungen und Quantenausbeute (Φ) der jeweiligen Dunkelzustände berücksichtigt werden. Neben einer unvoreilhaften Orientierung der RSB nach $C_{13}=C_{14}$ -Isomerisierung der 13-*cis*, 15-*syn*-Spezies, welche den pK_s -Wert der $RSBH^+$ nicht genügend reduzieren würde (Lórenz-Fonfría & Heberle 2014), wurden auch ungünstige Chromophor-Wasser-Wechselwirkungen im frühen Stadium des *syn*-Zyklus ins Gespräch gebracht (Bruun *et al.* 2015). Beide Faktoren könnten den Anteil an der Gesamtphotoreaktion entsprechend reduzieren. Des Weiteren wurde für den all-*trans*-Dunkelzustand in ASR eine Quantenausbeute von $\Phi = 40\%$ und für sein 13-*cis*-Pendant von ca. der Hälfte bestimmt (Wand *et al.* 2013). Da im DA_{app} von ReaChR ein höherer Anteil an all-*trans*-Retinal (78 %) vorliegt (*cf.* Abbildung 32I), welches zusätzlich eine vermeintlich größere Φ innehat, können die lichtinduzierten Photoreaktionen nach grüner Laseranregung hauptsächlich dem *anti*-Zyklus zugeordnet werden.

Die meisten publizierten Zwei-Zyklen-Modelle beinhalten mindestens einen Übergang zwischen den beiden Geschwisterzyklen, welcher die Equilibrierung unter bestimmten Belichtungsbedingungen sowie schlussendlich die Rückkehr in den IDA ermöglicht. Laut NMR-Messungen an *CrChR2* und *C1C2* wurde dem IDA ein homogener all-*trans*-Zustand zugrunde gelegt (Becker-Baldus *et al.* 2015; Bruun *et al.* 2015), auch wenn dieser Befund durch viele Retinal-Extraktionsexperimente (Nack *et al.* 2009; Stehfest *et al.* 2010; Stehfest & Hegemann 2010; Ritter *et al.* 2013; Govorunova *et al.* 2013; Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014) sowie Resonanz-Raman-Messungen (Nack *et al.* 2009; Muders, Kerruth, Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* 2014) in Frage gestellt wird. Ob der IDA von ReaChR ebenfalls von homogener Natur ist und ob die verwendeten lichtbasierten Methoden überhaupt imstande sind, dies zu eruieren, lässt sich nur spekulieren. Nichtsdestotrotz gilt ein entsprechender Übergang zwischen den beiden Zyklen als evident, da die beiden Dunkelzustände (D & D') unter sauren Bedingungen mit Lichtpulsen (5 - 10 s) von 400 nm oder 625 nm ineinander überführt werden können (*cf.* Abbildung 33C - E). Auch wenn die Absorptionsmaxima der induzierten DA_{app} 's entgegen den Komponenten des Gauß-Fits ($\Delta\lambda_{max} \sim 40$ nm) nur 12 - 18 nm spektral voneinander getrennt sind, wird eine $D \leftrightarrow D'$ -Konversion durch Doppelisomerisierung um $C_{13}=C_{14}$ und $C_{15}=N$ angenommen. Zwei schaltbare, spektral unterschiedliche Dunkelzustände bei pH 5 wurden auch für CsChrimson beobachtet (*cf.* Abbildung A 8B - D).

Weiterhin scheint die Equilibrierung der beiden Hauptisomere in ReaChR von der Asparaginsäure 196 im DC-Paar abzuhängen. Durch Mutagenese (D196N) verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des *syn*-Zyklus, da im Gegensatz zum WT im photostationären Zustand ein erheblicher Anteil von 13-*trans*-Photoprodukten detektiert werden konnte (*cf.* Abbildung 45). Eventuell beeinflusst das nichtionisierbare Asparagin 196 die thermische Doppelisomerisierung von 13-*cis*, 15-*syn* (D') nach 13-*trans*, 15-*anti* (D) und führt damit zu einer Anreicherung von D' im DA_{app} . Da in homologen Mutationen in Hybriden aus *CrChR1* und 2 sowie *CrChR2*-WT ein ähnliches FTIR-Bandenmuster inkl. der intensiven Bande bei

1173(+) cm^{-1} zu beobachten war (Inaguma *et al.* 2015), kann es sich sogar um einen konservierten Mechanismus innerhalb der ChR-Familie handeln. In elektrophysiologischen Messungen zeigten Mutanten des homologen D196 in *CrChR2* und *ReaChR* unter kontinuierlicher Belichtung einen reduzierten bis kaum ausgeprägten Peakstrom (Bamann *et al.* 2010; Wietek *et al.* 2014; Kaufmann *et al.* 2017). Infolgedessen wurde spekuliert, dass der transiente Kanalstrom hauptsächlich durch den leitenden Zustand des *anti*-Zyklus getragen wird und dass dieser als Folge der Anreicherung des *syn*-Zyklus in den Mutanten nicht zu beobachten sei (Kaufmann *et al.* 2017).

Bemerkenswerterweise ist die Grundzustandsheterogenität nicht nur abhängig von der Wellenlänge und Pulsdauer des eingestrahlt Lichts, sondern auch von dem pH-Wert. Während unter alkalischen Bedingungen nur sehr geringe, aber schnellere ($\tau = 18 \text{ s}$) Adaptationsphänomene auftreten (*cf.* Abbildung 33F, G), ist eine spektrale Verschiebung bei pH 5 hingegen deutlich ausgeprägt und die Etablierung des DA_{app} läuft langsamer ab ($\tau = 35 \text{ s}$) (*cf.* Abbildung 33A, B). Rozin *et al.* (2014) berichteten von einer Zunahme von 13-*cis*-Retinal im Dunkelzustand von ASR unter alkalischen Bedingungen. Da vorab der rapidere Photozyklus dem 13-*cis*, 15-*syn*-Dunkelzustand zugeordnet wurde, ließe sich der schnellere Photozyklus bei pH 9 mit einer Akkumulation des *syn*-Dunkelzustands bei geringer Protonenkonzentration erklären. Im Umkehrschluss könnte ein saures pH-Milieu den Anteil an all-*trans* erhöhen und für die Retardierung der Photoreaktionen (mit)verantwortlich sein.

4.7 Retinal-Konfiguration und Separation von Photozyklen

Obwohl es als evident angesehen werden kann, dass eine Wellenlängenabhängigkeit von *ReaChR* besteht (*cf.* Abbildung 33 & Abbildung 34) und dass die beobachtete Lichtadaptation (*cf.* Abbildung 32 & Abbildung 33) höchstwahrscheinlich mit der Veränderung der zugrunde liegenden Isomerenverhältnisse einhergeht, bedarf es dennoch weiterer Klärung der exakten Konfiguration der $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ - und der $\text{C}_{15}=\text{N}$ -Doppelbindung der gebundenen Retinal-Isomere in den jeweiligen Dunkelzuständen sowie in einzelnen Photozyklusintermediaten. Als Resultat der in der Arbeit vorgestellten Retinal-Extraktionsexperimente des DA_{app} ergab die chromatographische Trennung ein Verhältnis von all-*trans*:13-*cis* von 78:22 (*cf.* Abbildung 32I). Da im Zuge der Proteindenaturierung mit organischen Lösungsmitteln die RSB zum freien Aldehyd hydrolysiert, war keine Aussage über die $\text{C}_{15}=\text{N}$ -Doppelbindung des Chromophors möglich. Eine Retention der Konfiguration der $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ - und der $\text{C}_{15}=\text{N}$ -Doppelbindung wird durch vorheriges Hydroxylamin-Bleichen gewährleistet. Die gebildeten Retinal-Oxime lassen sich im Anschluss, aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten in der HPLC, unterscheiden (Groenendijk *et al.* 1979; Groenendijk *et al.* 1980). Eine analoge Vorgehensweise würde für rekombinantes *ReaChR* die Charakterisierung beider Doppelbindungskonformationen erlauben. Nichtsdestotrotz lassen sich keine „zeitaufgelösten“ Retinal-Extraktionsexperimente bewerkstelligen, da die simultane Belichtung während der Extraktion ungewünschte Photoreaktionen der freien Retinoide verursachen würde.

Im Gegensatz zu Extraktionsexperimenten ermöglichen Resonanz-Raman-Messungen die Charakterisierung der auftretenden Isomerengemische inkl. ihrer Konformationen im DA_{app} und in nachfolgenden Photozyklusintermediaten (Luck *et al.* 2015; Bruun *et al.* 2015). Demzufolge könnte Resonanz-Raman-Spektroskopie die Zuordnung von einzelnen Intermediaten zum zugrunde liegenden Retinal-Isomer erlauben. Als lichtunabhängige Methode würden NMR-Messungen mit isotoptenmarkiertem ¹³C₁₂-¹³C₁₅-¹³C₂₀-Retinal und ¹⁵N-Lysin₂₉₇ die Zuordnung der Konfiguration beider Doppelbindungen im IDA bzw. nach Belichtung auch in anderen Zuständen gewährleisten.

Auch die Studie der einzelnen vermuteten Photozyklen ließ sich durch gewisse Modifikationen erleichtern. Da für die meisten ChRs beide Dunkelzustände zwar in unterschiedlichen Anteilen, aber dennoch simultan von derselben Anregungswellenlänge angeregt werden, überlagern die resultierenden Photoreaktionen und erschweren die Zuordnung zu einzelnen Photozyklen (*cf.* Abbildung 34). Wie in Abbildung 33C und Abbildung A 8B gezeigt, könnte eine Vorbelichtung in der jeweiligen roten bzw. blauen Flanke des Chromophors das Isomerengemisch zugunsten des mehr blau- bzw. rot-absorbierenden Dunkelzustands verschieben. Eine nachfolgende Laseranregung in der zur Vorbelichtung konträren Flanke würde eine selektivere Anregung von einem der beiden Dunkelzustände ermöglichen. Ein analoger Ansatz wurde für die Akkumulation und anschließende Studie der beiden thermisch stabilen Zustände des bistabilen HKR1 angewendet (Luck *et al.* 2012).

Um eine Wellenlängenabhängigkeit der Isomerisierung der C₁₃=C₁₄- vs. C₁₅=N-Doppelbindungen in ReaChR zu untersuchen, könnte die Rekonstitution mit geblockten Retinal-Analoga (Mizukami *et al.* 1993; Zhong *et al.* 1996; Hou *et al.* 2001) eventuell Abhilfe schaffen.

4.8 Hydratisierungsdynamiken innerhalb der Kanalpore von ReaChR

Ein Großteil der Arbeit wurde der Studie des Mechanismus der Kanalöffnung und -schließung sowie den damit assoziierten Hydratisierungsänderungen in ReaChR gewidmet. Im geschlossenen Dunkelzustand von C₁ChR2 und C1C2 ist die Verteilung von Wassermolekülen innerhalb des Ionenkanals diskontinuierlich (Watanabe *et al.* 2013; Takemoto *et al.* 2015; Kuhne *et al.* 2015). Zwei räumliche Konstriktionen, das Innere und das Zentrale Tor, blockieren die Pore und inhibieren so den passiven Ionen-transport im unbelichteten Zustand (Kato *et al.* 2012). Im Rahmen der Photoaktivierung wird der für die Leitung essentielle Kanal ausgebildet. Der exakte Mechanismus sowie der eigentliche offene Zustand sind zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend unbekannt.

Bis dato existieren zwei Modelle, welche zwar beide eine sequentielle Kanalöffnung für C₁ChR2 propagieren, sich jedoch bezüglich der Hierarchie der Solvatisierung konkreter Proteinkompartimente unterscheiden. Das EHT-Modell (engl. *E90-Helix2-tilt*) besagt, dass nach Photoaktivierung erst das zentrale Tor kollabiert, bevor ein Wassereinstrom vom extrazellulären Halbkanal in die Region zwischen Zentralem und Innerem Tor stattfindet. Dieser induziert die

Auswärtsbewegung von H2, in dessen Folge die Wechselwirkungen des Inneren Tors gebrochen werden und eine kontinuierliche Wasserpore entsteht (cf. Abbildung 10B) (Kuhne *et al.* 2015). Im Gegensatz dazu favorisieren Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* (2015) eine initiale Wasserinvasion mit $\tau = 10 \mu\text{s}$ von der intrazellulären Seite in das Innere Tor, während die zentrale Konstriktion im Proteininneren aufrechterhalten wird. In einem zweiten Schritt ($\tau = 200 \mu\text{s}$) erfolgt dann die Bildung der transmembranen wassergefüllten Ionenpore. Im zweiten Modell wird zusätzlich ein konzertiertes Schließen des Kanals vorhergesagt. Mit $\tau = 10 \text{ ms}$ migriert das im Ionentransportweg befindliche Wasser zur intrazellulären Seite und der extrazelluläre Halbkanal wird auf Höhe des Zentralen Tors durch die Reetablierung der Wasserstoffbrücken von S62, E90 und N258 (S102, E129 & N297 in C1C2) abgeschnürt. Die beiden Hypothesen werden jeweils durch einige spektroskopische und bildgebende Verfahren sowie durch Computersimulationen unterstützt, mit welchen globale Helixbewegungen von H2, H6 und H7 sowie eine partielle Aufwindung des cytoplasmatischen Terminus der H2 innerhalb des Photozyklus beobachtet wurden (Krause *et al.* 2013; Sattig *et al.* 2013; Takemoto *et al.* 2015; Müller *et al.* 2015; Volz *et al.* 2016).

Die beiden vorgestellten Modelle basieren zum größten Teil auf Erkenntnissen aus schwingungsspektroskopischen Befunden. Aufgrund der Überlagerung einer Vielzahl derselben funktionellen Gruppen in ChRs bietet FTIR, ohne eine ausgiebige Mutagenesestudie, aber keine bzw. wenig örtliche Informationen. Um sich dennoch der sehr sensitiven Infrarotspektroskopie zu bedienen und zusätzlich eine hohe Ortsauflösung zu generieren, wurde sich des artifiziellen IR-Sensors *p*-Azido-L-phenylalanin (azF) bedient. azF konnte mittels Amber-Stopp-Codon-Suppression (cf. Abbildung 48A) ortsspezifisch in das Protein der Wahl integriert werden und ermöglichte, aufgrund seiner Absorption im nichtproteinogenen Spektralfenster $> 1800 \text{ cm}^{-1}$, die simultane Detektion von intrinsischen Proteinschwingungen und deren des Markers. Zusätzlich ist azF solvatochrom, weshalb sich seine Absorption in Abhängigkeit der Polarität der Umgebung zu höheren bzw. niedrigeren Frequenzen verschiebt (cf. Abbildung 51A).

Da die Expression von ChRs in *Escherichia coli* im Rahmen der Arbeit nicht von Erfolg gekrönt war, wurde die Amber-Suppression in HEK293T-Zellen durchgeführt. Für die erfolgreiche Inkorporation von azF in ChRs wurde ein orthogonales Paar eines *Homo sapiens*-*Bacillus stearothermophilus*-tRNA_{CUA}-Hybrids mit geändertem Anticodon (Ye *et al.* 2008) und einer modifizierten *E. coli*-Tyrosyl-tRNA-Synthetase (Deiters *et al.* 2003) verwendet (cf. Abbildung 48A). Da die größten Hydratisierungsänderungen innerhalb des Ionenkanals zu erwarten sind, wurden insgesamt vier verschiedene Positionen in den porenbildenden H1 (Y110; Y70 in CrChR2), H2 (K133; K93 in CrChR2) und H7 (Y283 & N305; Y243 & H265 in CrChR2) sowie vier weitere Positionen in deren direkter Nachbarschaft – dem intrazellulären (Y112, W115 & C119; Y72, W75 & C79 in CrChR2) und dem extrazellulären Loop 1 (F142; F102 in CrChR2) – ausgewählt (cf. Abbildung 52A). In Analogie zu bovinem Rhodopsin (Ye *et al.* 2009) und C1C2 (cf. Abbildung A 11) war die Suppressionseffizienz abhängig von der konkreten Lage im Protein. Im Allgemeinen ließ sich ein negativer Trend in Richtung des C-Terminus formulieren. Ye *et al.* (2009) interpretierten diese Tendenz als partielle Blockade des Sec-Translocons durch verkürzte Translationsprodukte infolge einer gescheiterten Amber-Suppression. Zusätzlich muss aber die

funktionelle Relevanz einiger Reste wie z.B. C119 (C79 in CrChR2) im ICL1 (Krause 2016) als mögliche Ursache für eine geringe Expression angeführt werden. Des Weiteren führte die Inkorporation des sterisch anspruchsvollen azF in den räumlich limitierten Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor (V99-Homolog in Chronos; A59 in CrChR2) sowie auf Höhe des Gegenionenkomplexes (C106-Homolog in Chronos; L66 in CrChR2) zu keiner Chromophorbindung (nicht gezeigt).

Die azF-Mutanten, welche vernünftige Ausbeuten lieferten, wurden dann mittels zwei verschiedener FTIR-Methoden (photostationär & *rapid-scan*) untersucht. Sowohl in den photostationären Differenzspektren (~ 530 nm LED-Belichtung) als auch in den zeitaufgelösten Amplitudenspektren (532 nm Laseranregung) wurden für die Positionen innerhalb der Ionenpore (Y110, K133 & F142) Signale bei ca. 2100 cm^{-1} detektiert (cf. Abbildung 52C & Abbildung 53A). Diese waren von komplexer Beschaffenheit und bestanden zumeist aus einer bis zwei negativen und zwei positiven Banden. Die Komplexität rührt höchstwahrscheinlich von verschiedenen Seitenkettenrotameren des azF sowie der Koexistenz mehrerer Photointermediate (cf. Abbildung 44) mit unterschiedlichen Reporterorientierungen. Dennoch können intrinsische Eigenschaften wie Fermi-Resonanz (Dyall & Kemp 1967; Nydegger *et al.* 2010; Lipkin *et al.* 2011) oder Überlagerungen von symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen (Silverman *et al.* 2007) der Azidogruppe nicht ausgeschlossen werden.

Da in nahezu allen Proben die positive hochfrequenter Banden (Markerbanden) konserviert war, wurde dessen spektrale Lage als Indikator für die Polarität der Umgebung ausgenutzt. In den *rapid-scan*-Messungen der drei Mutanten lag die Markerbande bei 2129 cm^{-1} (K133azF), 2123 cm^{-1} (F142azF) und 2119 cm^{-1} (Y110azF) (cf. Abbildung 53A). In Analogie zu IR-Messungen an freiem azF (Ye *et al.* 2009; Bazewicz *et al.* 2013), 3-*p*-Azidophenyl-Propionsäure (Wolfshorndl *et al.* 2012) und β -Azidoalanin (Oh *et al.* 2008) impliziert eine Verschiebung von $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3)$ zu größeren Wellenzahlen eine Zunahme der Polarität der Umgebung, welche primär durch die Ausbildung von H-Brücken zwischen Wassermolekülen und der Azidogruppe getragen wird. Demzufolge wird die höchste Polarität innerhalb des extrazellulären Halbkanals auf Höhe des Gegenionenkomplexes vermutet, während der Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor weniger polar zu sein scheint. Die gezogenen Schlüsse lassen sich gut mit der elektrostatischen Situation im geschlossenen Zustand in Einklang bringen. K133 steht in engem Kontakt mit der elektronegativen Ionenpore (Abbildung 61A). Im Gegensatz dazu ist F142 weiter entfernt und ragt eher in Richtung der extrazellulären Kanalöffnung.

Computersimulationen postulierten einen wassergefüllten extrazellulären Halbkanal, aber nur eine kleine Ansammlung einiger Moleküle im Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor (Watanabe *et al.* 2013; Takemoto *et al.* 2015). In der Kristallstruktur von C1C2-GA (Kato, Kamiya *et al.* 2015) lässt sich eine kleine Kavität in diesem Proteinsegment ausmachen, welche bereits im Dunkelzustand eine geringe Wasserpopulation beherbergen könnte (Abbildung 61A). Aufgrund des geringeren Hydratisierungsgrades der Azidogruppe an Position 110 könnte die Bandenverschiebung zu kleineren Frequenzen im Vergleich zu den anderen beiden Positionen erklärt werden. Dieser Verdacht konnte durch die Berechnung der SASA (engl. *solvent accessible surface area*) der drei Aminosäureseitenketten mit dem bioinformatischen Werkzeug GETAREA

(Fraczkiewicz & Braun 1998) erhärtet werden. Auf Basis der hochaufgelösten Dunkelstruktur von C1C2-GA wurde für die homologen Reste von Y110, K133 und F142 eine Fläche von 10.8, 22.9 und 17.9 Å² prognostiziert. Die Größe der hydratisierten Fläche korreliert für die drei Positionen mit der spektralen Lage des azF-Signals.

Über die Amplitude des Differenzsignals wurde auf die Solvatisierungsänderungen der Label an den verschiedenen Positionen geschlossen. Da der Zerfall der Amplitudenspektren ($t_{1/2}$) in den überwiegenden Fällen mit der Abklingkinetik des Ionentransports (τ_{off}) korrelierte (cf. Abbildung 53 & Abbildung 54), wurden die beobachteten Hydratisierungsdynamiken dem Kanalschluss zugeordnet. Aufgrund der intensiven Differenzbanden von Y110azF (cf. Abbildung 52C, Abbildung 53A) wurden große Hydratisierungsänderungen innerhalb des Inneren Tors vermutet. Eine Annahme, welche sich mit dem Einstrom von Wasser nach Kanalöffnung in den im Dunkelnzustand wenig hydratisierten Bereich vereinbaren ließe (Abbildung 61B). Im Gegenzug suggeriert das schwache Bandenmuster von K133azF und F142azF (cf. Abbildung 52C & Abbildung 53A) einen geringen Unterschied zwischen dem hydratisierten Dunkel- und dem ähnlich hydratisierten offenen Zustand. Diese Vermutungen lassen sich unter Ausnützung des linearen Zusammenhangs zwischen ν_{max} von freiem azF und dem wässrigen Anteil (% H₂O) in einer Reihe von Wasser-Isopropanol-Mischungen (cf. Abbildung 51C) weiter unterstützen. Die spektrale Lage der Markerbanden suggeriert für den belichteten Zustand der Azidomutanten einen Hydratisierungsgrad (% H₂O) von ca. 4 % (Y110azF), 85 % (K133azF) und 36 % (F142azF). Der vermeintlich kleine Wert von Y110azF überrascht. Allerdings befindet sich die dort lokalisierte N₃-Gruppe im Dunkelnzustand bereits in einer sehr hydrophoben und entwässerten Umgebung, was das $\nu_{\text{max}}(\text{N}_3)$ im FTIR-Dunkelspektrum von Y110azF impliziert (cf. Abbildung 51D), weshalb selbst ein geringer lichtgetriebener Wassereinstrom die Polarität der Labelumgebung dramatisch erhöhen. Als Konsequenz der großen solvatochromen Verschiebung würde es zu wenig Auslöschung der Signalintensität im Differenzspektrum kommen. Im Umkehrschluss wird für die beiden anderen Mutanten ein Hydratisierungsgrad mit sehr ähnlichen Werten für Dunkel- und belichteten Zustand vermutet, so dass der Unterschied gering und die Überlagerung groß ausfällt. Die moderate Hydratisierung von F142azF könnte strukturelle Ursachen haben. Zumindest ist in der geschlossenen Kanalkonfiguration von C1C2-GA (PDB: 4yzi) der homologe Rest (F141) in einem Arrangement aus hydrophoben Aminosäuren (H44, Y148 & Y282 in C1C2; H45, W149 & Y283 in ReaChR) eingesäumt, was die Exposition zur wässrigen Phase einschränken könnte.

Die photostationären IR-Spektren von Y112azF und C119azF (beide ICL1) zeigten kein entsprechendes Differenzsignal (cf. Abbildung 52C). Auf Basis der vorab postulierten Hypothese scheinen die beiden Reste im Dunkel- und im belichteten Zustand einen ähnlichen Hydratisierungsgrad aufzuweisen. Da die korrespondierenden Streckschwingungen vermutlich nicht gegeneinander verschoben sind, also im gleichen Spektralbereich absorbieren, löschen sie sich im Differenzspektrum gegenseitig aus. Anhand dieses Befunds ist das Einsatzgebiet des IR-Reporters primär auf die Detektion von Konformationsänderungen limitiert, welche mit einer Ab- bzw. Zunahme der Hydratisierung einhergehen. Für „reine“ Proteindynamiken ohne entsprechende Solvatisierungsänderungen scheint die N₃-Funktionalität wenig empfänglich bis

insensitiv zu sein. Immerhin wurde an der C119-homologen Position in CrChR2 in EPR- und Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen beträchtliche Konformationsänderungen des verknüpften Spin- sowie Fluoreszenzmarkers nach Photoaktivierung detektiert (Sattig *et al.* 2013; Krause *et al.* 2013; Volz *et al.* 2016). Alternativ könnten die induzierten Labelbewegungen / Hydratisierungsänderungen an diesen Positionen schneller als die „Zeitauflösung“ der IR-Messung sein und haben bereits im photostationären Zustand eine dunkelzustandsanaloge Konfiguration angenommen.

Trotz Hitzeartefakten und einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis in *step-scan*-FTIR-Messungen an ReaChR-Y110azF konnten Markeränderungen zwischen 20 und 50 μ s nach Laseranregung detektiert werden (*cf.* Abbildung 53C), welche mit einer initialen Kanalöffnung einhergehen könnten. Spektral ist in diesem Zeitbereich der L \rightarrow M-Übergang ($t_{1/2} = 10.8 \pm 0.3 \mu$ s, *cf.* Abbildung 31G) verortet. Lórenz-Fonfría, Bamann *et al.* (2015) postulierten einen partiellen Wassereinstrom von der intrazellulären Seite in CrChR2 mit einer Zeitkonstante von $\tau = 10 \mu$ s. Der geringe kinetische Unterschied ließe sich mit dem tendenziell langsameren Photozyklus in ReaChR gegenüber CrChR2 vereinbaren.

Ferner wurde der Einfluss einiger Aminosäuren des Inneren Tors auf den Kanalschluss und die damit assoziierten Solvatisierungsdynamiken untersucht. Dazu wurde ReaChR-Y110azF mit folgenden Mutationen E122Q, E123Q, N305H, R308H & R308N (E82, E83, H265 & R268 in CrChR2) erweitert und schwingungsspektroskopisch (*rapid-scan*-FTIR) charakterisiert (*cf.* Abbildung 55). Um die beobachteten Änderungen der Mutanten entsprechend interpretieren zu können, bedarf es zuallererst der Klärung der konkreten molekularen Architektur innerhalb des Inneren Tors. In der ersten Kristallstruktur von 2012, welche für C1C2 unter sauren Bedingungen (pH 5.8) gelöst wurde, stabilisieren Wechselwirkungen zwischen E121 und R307 sowie E122 und H173 den Zusammenhalt der räumlichen Barriere (Kato *et al.* 2012). Während die erst genannte Interaktion auch in der hochaufgelösten Struktur des blau-verschobenen C1C2-GA (T198G & G202A) bei pH 7.0 konserviert vorliegt, ragt E122 in Richtung des Cytoplasmas und könnte direkt mit der intrazellulären wässrigen Phase wechselwirken (Kato, Kamiya *et al.* 2015) oder geht wie E121 eine Bindung mit R307 ein (*cf.* Abbildung 54A, *unten*) (Volz *et al.* 2016; Takemoto *et al.* 2015). Aufgrund der pH-abhängigen Umorientierung von E122 (E123 in ReaChR) wurde bei saurem pH eine Wasserstoffbrückenbindung zu H173 (protoniertes E122) und bei neutralem pH eine Salzbrücke zu R307 (deprotoniertes E122) postuliert (Kato, Kamiya *et al.* 2015). Der von den Autoren prognostizierte pK_s -Wert von 5.4 von E122 (E123 in ReaChR) unterstützt diese Annahme. Zum gleichen Schluss kamen Computersimulationen mit fixiertem deprotoniertem bzw. protoniertem E122 in C1C2 (Takemoto *et al.* 2015) und Wasserdynamiken an CrChR2 (Kuhne *et al.* 2015).

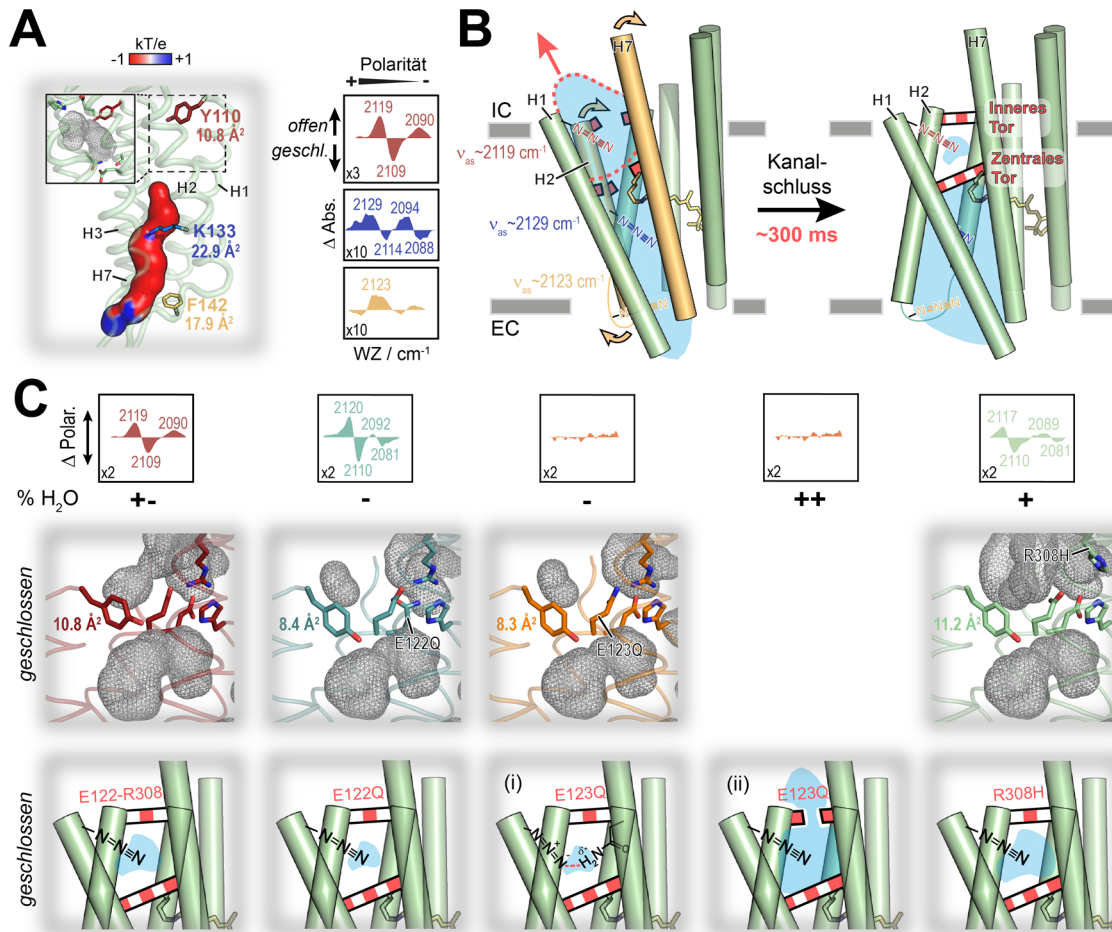


Abbildung 61: Hydratisierungsänderungen der Kanalpore in ReaChR. **A)** Strukturmodell von ReaChR auf Basis von C1C2-GA (PDB: 4yzi). Der extrazelluläre Halbkugel (MOLE 2.0) wurde entsprechend seinem elektrostatischen Potential der Oberfläche angefarbt (APBS-Plug-In; k, Boltzmann-Konstante; T, Temperatur; e, Elementarladung). Y110 (rot), K133 (blau) und F142 (gelb) sind farblich markiert. Die SASA (engl. solvent accessible surface area, in Å²) der Aminosäureseitenketten der drei homologen Positionen von C1C2-GA (PDB: 4yzi) wurde mit GETAREA berechnet. Der Einschub zeigt eine Kavität im Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor. Vergrößerte FTIR-Doppeldifferenzspektren ($\Delta\text{Abs}_{\text{azF-Mutante}}$ minus $\Delta\text{Abs}_{\text{WT}}$) des Azidobereichs von ReaChR-Y110azF (rot), -K133azF (blau) und -F142azF (gelb) sind illustriert (rechts). **B)** Hydratisierungsänderungen bei Kanalschluss in ReaChR. Im Zuge des Kanalschlusses ($t_{1/2} \sim 300$ ms) bewegen sich H2 und H7, infolgedessen Wasser aus dem Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor zur intrazellulären Seite migriert (rot-gestrichelt). Nach Reformierung der beiden räumlichen Konstruktionen (rot-weiße Baken) verbleibt im geschlossenen Zustand eine kleine Ansammlung von Wassermolekülen im Zwischensegment. Die Positionen der drei Azidomutanten aus A und die Maxima der positiven Markerbanden sind farblich skizziert. **C)** Einheitlich skalierte FTIR-Doppeldifferenzspektren der Y110azF-Doppelmutanten E122Q (türkis), E123Q (orange) und R308H (grün) im Vergleich zu ReaChR-Y110azF (rot) (oben). Der Hydratisierungsgrad (% H₂O) von Y110azF im geschlossenen Zustand der einzelnen Mutanten wurde abgeschätzt. Kavitäten in der Kristallstruktur von C1C2-GA und in den homologen Mutanten des Inneren Tors (SWISS-Model auf C1C2-GA) sind illustriert (Mitte). Die SASA des Y110-Homologs in den einzelnen Mutanten wurde wie oben beschrieben bestimmt. Der Einfluss der Mutagenese auf den Hydratisierungszustand der Region zwischen Innerem und Zentralem Tor in ReaChR ist vereinfacht dargestellt (unten). Im Falle von Y110azF-E123Q wird entweder eine direkte Wechselwirkung von Q123 mit der N₃-Gruppe (i) oder ein undichtiges Inneres Tor (ii) im geschlossenen Zustand für das Verschwinden des Azidosignals verantwortlich gemacht.

Neben der höheren Stabilität von Salzbrücken gegenüber Wasserstoffbrückenbindungen sprechen zahlreiche FTIR-spektroskopische Messungen für zwei deprotonierte Glutamate im Inneren Tor (Schneider *et al.* 2015). Falls die (De-)Protonierung von E122 sowie von dessen

Homologen für den Photozyklus relevant wären, müsste eine korrespondierende Bande im Carboxylbereich ($1780 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) entweder verschwinden oder entstehen (*cf.* Abbildung 46B). Durch eine Serie von Mutanten konnten aber alle beobachteten Protontransferreaktionen in CrChR2 bei $\text{pH} \sim 7$ konkreten Resten im Zentralem Tor (E90), im DC-Paar (D156) sowie im Gegenionenkomplex (D253) zugeordnet werden (Ritter *et al.* 2008; Eisenhauer *et al.* 2012; Lórenz-Fonfría *et al.* 2013). Analoge (De-)Protonierungsschritte wurde im Rahmen der Arbeit ebenfalls für ReaChR beobachtet (*cf.* Abbildung 46A). Es scheint daher plausibel für die rot-verschobene Chimäre ein deprotoniertes E122-Homolog (E123 in ReaChR) anzunehmen, welches vermutlich mit R307 (R308 in ReaChR) wechselwirkt. Da das R307-Homolog folglich zwei H-Brücken ausbilden würde, kann diesem ein essentieller Stabilitätsbeitrag zum Inneren Tor zugeschrieben werden.

Diese Hypothese lässt sich gut mit experimentellen Befunden an ReaChR in Einklang bringen: Zum einen war in der neutralisierten ReaChR-Mutante Y110azF-R308N keine Chromophorbindung zu beobachten und die lichtinduzierten Kanalströme in elektrophysiologischen Messungen waren gegenüber dem WT und Y110azF deutlich reduziert (*cf.* Abbildung 54B, C). Zum anderen war die Kinetik der Konformationsänderungen nach Substitution gegen das kleinere Histidin (Y110azF-R308H) ca. 4.5fach verlangsamt (*cf.* Abbildung 55A). Ähnliche Tendenzen äußerten sich für die Mutagenese seines Counterparts, der Glutaminsäure E122 (E121 in C1C2), dessen lichtinduzierte Kanalströme in Y110azF-E122Q ebenfalls verringert waren (*cf.* Abbildung 54C). Zusätzlich war die Zerfallskinetik des Amplitudenspektrums signifikant beschleunigt (*cf.* Abbildung 55A). Während die Substitution von E122 einen erheblichen Einfluss hat, liegen sowohl die Amplituden der Photoströme, als auch die Kinetik des FTIR-Amplitudenspektrums von ReaChR-Y110azF-E123Q (E122 in C1C2) in der gleichen Größenordnung wie die einfache azF-Mutante Y110azF (*cf.* Abbildung 54C & Abbildung 55A). Dieser Trend deckt sich mit Beobachtungen für CrChR2 (Sugiyama *et al.* 2009). Abschließend sollte erwähnt werden, dass das E123-Homolog (ReaChR-Nomenklatur) in manchen ChRs wie z.B. *Mt*ChR (Protein-ID: AEI83869) (Govorunova *et al.* 2011) und *Pg*ChR1 nicht konserviert ist. Zusammenfassend kommt der Wechselwirkung zwischen den E122- und R308-homologen Aminosäuren (E121 & R307 in C1C2) in ChRs eine größere Bedeutung bzgl. Ionentransport und Kanalschlusskinetik zu.

Im Vergleich zu ReaChR-Y110azF induziert die zusätzliche E122Q-Mutation eine Vergrößerung und R308H eine Verkleinerung der Amplitude des Azidodifferenzsignals in den FTIR-Spektren (*cf.* Abbildung 55C & Abbildung 61C, *oben*). Um die zugrunde liegenden größeren (E122Q) bzw. kleineren (R308H) Hydratisierungsänderungen zu interpretieren, müssen sowohl die geschlossene als auch die geöffnete Konfiguration des Kanals berücksichtigt werden. Somit könnte E122Q entweder eine weitere Kanalöffnung oder eine stärkere Dehydratisierung des Dunkelizustands verursachen. Beide Szenarien würden sich in einem vergrößerten Differenzsignal äußern. Im Umkehrschluss könnte R308H den Wassereinstrom im Rahmen der Kanalbildung reduzieren oder eine größere residuale Wasserkonzentration im Dunkelizustand bewirken. Um den Einfluss der konservativen Mutanten auf vermeintliche Hydratisierungsänderungen auch quantitativ diskutieren zu können, wurde für alle

Doppelmutanten die SASAs des Y110-homologen Tyrosins bestimmt. Dazu wurden Strukturmodelle der Mutanten des Inneren Tors mithilfe von *SWISS-Model* (Biasini *et al.* 2014) generiert. Bereits bei Vergleich der Kavitäten um das Innere Tor lassen sich deutliche Unterschiede festhalten (Abbildung 61C, Mitte). Im wildtypischen C1C2-GA ist sowohl ober- als auch unterhalb des Inneren Tors eine Proteintasche ausgeprägt. Die Mutagenese der sauren Aminosäuren induziert eine Verkleinerung beider Vestibüle, wohingegen die Substitution von Arginin 307 (R308 in ReaChR) in einer Aufweitung der zum Cytoplasma orientierten Kavität resultiert. Die berechneten SASA untermauern diese Beobachtungen. Mit 8.4 und 8.3 Å² für die E122Q- und E123Q-homologen Substitutionen in C1C2-GA war die SASA des Y110-Homologs im Vergleich zum WT (10.8 Å²) reduziert. Der R308H-homologe Aminosäureaustausch bewirkt eine leichte Vergrößerung der SASA auf 11.2 Å². Auf dieser Basis ließe sich der Ursprungsverdacht eines weniger (E122Q) und eines stärker hydratisierten (R308H) Azidoreporters im Dunkelnzustand von ReaChR erhärten.

Bemerkenswerterweise ist im FTIR-Spektrum von Y110azF-E123Q keine Azido-Streckschwingung zu beobachten. In Analogie zu Y112azF und C119azF ist das Ausbleiben eines Signals mit keinen bzw. vernachlässigbaren Hydratisierungsänderungen zu erklären. Es stellt sich allerdings die Frage, wie das im hiesigen Kontext realisiert werden kann. Zum einen könnte das eingebrachte Glutamin die Wasserinvasion in das Innere Tor inhibieren. Takemoto *et al.* (2015) beobachteten, dass die Wechselwirkung zwischen dem protonierten E122 in C1C2 (E123 in ReaChR) zu H173 (H174 in ReaChR) in deren Simulationen (150 ns) kurzzeitig gebrochen, aber gegen Ende restauriert wurde. Als Konsequenz konnten nur wenige Wassermoleküle in den Bereich zwischen Innerem und Zentralem Tor migrieren. Da ein neutrales Glutamin meist als Äquivalent für eine protonierte Glutaminsäure angesehen wird, könnte das gleiche Szenario auch für ReaChR E123Q zutreffen.

Alternativ wäre auch eine direkte Interaktion von Q123 mit azF (~4 Å entfernt, basierend auf Modell) denkbar. Das freie Elektronenpaar am terminalen Stickstoff der dipolarophilen N₃-Gruppe könnte mit dem partiell positiv geladenen Wasserstoffatom der Amidgruppe von Q123 wechselwirken und so jegliche Konformationsänderungen des Markers unterbinden (Abbildung 61C, *unten*, i). Obwohl der Label laut berechnetem SASA des homologen Y110 in E123Q im Dunkelnzustand partiell hydratisiert vorliegen müsste, wäre die Sensitivität der Azidofunktionalität gegenüber Polaritätsänderungen durch die Wechselwirkung beeinträchtigt.

Zusätzlich wäre ein vollständig hydratisiertes Inneres Tor im eigentlich „geschlossenen“ Zustand denkbar. Auch wenn die oben gemachten Ausführungen zum Inneren Tor eher das Gegenteil favorisieren, könnte die interhelikale Interaktion zwischen E123 (H2) und H174 (H3) in ReaChR einen größeren Stellenwert für die Blockierung von Ladungsträgern und Wasser innehaben. Ein durch Mutagenese induzierter Bruch könnte einen Wassereinstrom bereits im Dunkelnzustand verursachen, während der Kanal weiterhin durch das Zentrale Tor geschlossen wäre. Da die N₃-Funktionalität also bereits vor der eigentlichen Kanalöffnung vollständig hydratisiert vorliegen würde, wäre keine weitere Solvatisierung nach Lichtstimulation mehr zu beobachten (Abbildung 61C, *unten*, ii).

Neben der Amplitude der Differenzsignale wurde auch die Bandenlage der prominenten positiven Markerbande berücksichtigt. E122Q ($\nu_{\text{as}}(\text{N}_3) = 2120 \text{ cm}^{-1}$) verursachte im Vergleich zu Y110azF ($\nu_{\text{as}}(\text{N}_3) = 2119 \text{ cm}^{-1}$) eine Verschiebung um 1 cm^{-1} in den hochfrequenten Bereich und R308H eine Verschiebung zu kleineren Frequenzen ($\nu_{\text{as}}(\text{N}_3) = 2117 \text{ cm}^{-1}$). In der Reihe der drei Mutanten korreliert die Blauverschiebung von ν_{max} mit der Zunahme der Amplitude des Differenzsignals (cf. Abbildung 55C).

Die präsentierten Resultate zeigen sehr eindrucksvoll die Stärken, aber auch die Schwächen des verwendeten Systems. Bei der Inkorporation von azF im Inneren Tor an Position 110 war anstelle der wildtypischen Deprotonierung, eine Wasserstoffbrückenbindungsänderung von E130 (Zentrales Tor) zu beobachten (cf. Abbildung 52D & Abbildung 53B). Zusätzlich wurde eine schnellere Kanalschlusskinetik von Y110azF im Vergleich zum WT bilanziert (cf. Abbildung 50F). Auch der Austausch des Lysins 133 als Teil des komplexen Gegenions resultierte in Unterschieden im Carboxylbandenmuster (cf. Abbildung 52B & Abbildung 53B). Die Änderungen könnten durch nichtnative Wechselwirkungen der N_3 -Funktionalität mit der Proteinumgebung begründet werden. Immerhin vermag die artifizielle Gruppe mit H^+ -Donoren wie z.B. Amiden zu interagieren (Abbildung 61C, *unten*, ii). Es ist zu betonen, dass die Ortsauswahl für die Einführung des IR-Reporters schwierig ist und dass meist ein Kompromiss zwischen funktioneller Konservierung und einer guten Lokalisation des Hydratisierungssensors getroffen werden muss. Gerade in der Porenregion, welche zwar bezüglich des Ionentransports das größte Interesse genießt, könnte eine Substitution gegen das sperrige azF kritisch sein.

Im Gegensatz zu allen konventionellen schwingungsspektroskopischen Ansätzen, ermöglicht der ortsspezifische Einbau der artifiziellen IR-Reporter die simultane Detektion von globalen und lokalen Proteindynamiken. Durch die Generierung der hohen Ortsauflösung ist die gezielte Studie von Mikroumgebungen ohne großangelegte Mutagenesestudie möglich. Da die Azidogruppe in protischen Solventien, vor allem Wasser, H-Brücken auszubilden vermag und sich dadurch das Absorptionsmaximum zu höheren Frequenzen verschiebt, erlaubt die Evaluierung der spektralen Lage und der Amplitude des azF-Differenzsignals eine Einschätzung der Polarität der Labelumgebung, sowie der lichtinduzierten Hydratisierungsänderungen. Auf dieser Basis konnten mittels photostationärer und zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie Solvatisierungsdynamiken innerhalb der Kanalpore der grün-absorbierenden ChR-Chimäre ReaChR infolge des Kanalschlusses untersucht werden. Zusätzlich suggerierte eine ausgedehnte Mutagenesestudie des Inneren Tors, dass die räumliche Konstriktion den Wassereinstrom und -ausstrom in den Grenzbereich zwischen Innerem und Zentralem Tor moduliert.

4.9 Stopp-Codon-Suppression und FTIR-Spektroskopie mit unnatürlichen Reportergruppen

Um neben den direkten und indirekten Evidenzen für den erfolgreichen Einbau von azF in ChRs eine weitere hinzuzufügen, wäre eine massenspektrometrische Analyse nach

Proteinaufreinigung der azF-Mutanten sicher wertvoll. Auf dieser Basis ließe sich auch das Ausmaß einer möglichen Reduktionsreaktion, wie für Azido-L-homoalanin (azHA, cf. Abbildung 19, 2) berichtet (Kück *et al.* 2002), zum nicht IR-aktiven *p*-Amino-L-phenylalanin bewerten. Die funktionelle Charakterisierung der IR-aktiven Azidomutanten K133azF und F142azF von ReaChR mittels elektrophysiologischer Messungen sind für die weitere Aufklärung des Kanalschlussmechanismus von großem Interesse. Des Weiteren wären Computersimulationen hilfreich, um vermeintliche vom Marker ausgehende Wechselwirkungen einschätzen und quantifizieren zu können. Da es sich bei azF um eine unnatürliche Aminosäure handelt, bedürfte dieses Unterfangen jedoch zuallererst der (zeitaufwendigen und komplexen) Parametrisierung der Seitengruppe. Obwohl bereits bioinformatische Werkzeuge wie z.B. SwissSidechain (Gfeller *et al.* 2012) den Fokus auf nichtkanonische Aminosäuren gelegt haben, deckt ihr Kanon nur Azido-L-alanin (azA, cf. Abbildung 19, 1) bzw. einige (S)CN-Derivate ab. Weiterhin wäre Stark-Spektroskopie eine gute Ergänzung. Die definierten experimentellen Bedingungen (immobilisierte Probe & kontinuierliches, externes elektrisches Felds) würden die Zerlegung in Polarisations- und Dipolmomentsänderungen erlauben. Da die *Stark tuning rate* allerdings nur für ein paar Azidonukleoside (Silverman *et al.* 2007) bekannt ist, ist eine Kalibrierung von azF unabdingbar. Anschließend könnten die spektralen Verschiebungen dann auch Änderungen des intrinsischen elektrischen Felds des Proteins zugeordnet werden.

Die Reaktivität von azF gegenüber UV-Strahlung wurde in einigen Studien erfolgreich für die Verbrückung von Dimerschnittstellen (Chin *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2014) oder von Liganden mit deren Bindetasche (Grunbeck *et al.* 2012; Coin *et al.* 2013) mittels Photocrosslinking ausgenutzt. Von einer IR-spektroskopischen Perspektive betrachtet, stellt diese Photolabilität allerdings einen Nachteil dar, da sich die Signalintensität der N₃-Gruppe unter Belichtung reduzieren bzw. es zu einer ungewollten Kopplungsreaktion innerhalb des Proteins kommen könnte. Bazewicz *et al.* (2013) berichteten, dass das nur eine CH₂-Gruppe längere *p*-Azidomethyl-L-phenylalanin (cf. Abbildung 19, 6) eine höhere Photostabilität gegenüber UV-Strahlung besitzen würde.

Die Inkorporation von kleineren azidotragenden Aminosäuren wie azA (Kück *et al.* 2002; Oh *et al.* 2008) oder azHA (Kück *et al.* 2002; Taskent-Sezgin *et al.* 2010; Choi *et al.* 2011; Bloem *et al.* 2012) könnten einen Einbau in räumlich limitierte Proteinregionen ermöglichen. Jedoch besitzen diese IR-Sensoren, aufgrund des fehlenden aromatischen Rings, einen kleineren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{azA}} = 414 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ & $\epsilon_{\text{azHA}} = 350 - 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Oh *et al.* 2008; Bloem *et al.* 2012) gegenüber azF ($\epsilon_{\text{azF}} = 680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Suydam & Boxer 2003). Dieser müsste durch eine größere Probenquantität kompensiert werden.

Da die IR-Spektren von Substanzen mit Azidogruppe im Allgemeinen von hoher Komplexität sind, vermutlich aufgrund von anharmonischer Kopplung (Dyall & Kemp 1967; Nydegger *et al.* 2010; Lipkin *et al.* 2011) bzw. Überlagerungsphänomenen (Silverman *et al.* 2007), wäre der Einsatz von Nitril- oder Thiocyanatreportern in Betracht zu ziehen (cf. Abbildung 19). Obwohl diese zwar tendenziell einen kleineren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 32 - 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Suydam & Boxer 2003; Getahun *et al.* 2003; Fafarman *et al.* 2006; Oh *et al.* 2008; Ma *et al.* 2015) besitzen, ist die Interpretation der simpleren Infrarotspektren erleichtert.

Eine geringe Probenquantität war in dem HEK293T-basierten System häufig limitierend. Da die Ausbeuten der Azidomutanten je nach Position zwischen $m < 1$ und $\sim 10 \mu\text{g}/\text{Kulturschale}$ lagen (cf. Abbildung 52B), waren nur für die moderat bis gut exprimierenden Mutanten aussagekräftige Infrarotmessungen möglich. Die eigentlich geplanten *step-scan*-Messungen an allen azF-Varianten scheiterten an den benötigten Probenmengen, welche auch nach Upscaling des Kultivierungsmaßstabs nur schwer bis überhaupt nicht erreicht werden konnten. Durch die Verwendung eines dualen Vektorsystems, welches für beide Bestandteile des orthogonalen Paares, d.h. Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Suppressor-tRNA, kodiert, könnte die Expression alleine aus statistischen Gründen erhöht werden. Da die hier verwendete Amber-Suppression nur bei erfolgter Kotransfektion dreier Vektoren funktioniert, würde eine Reduktion auf eins bzw. zwei Plasmide die Transfektionseffizienz bereits entsprechend vergrößern (Cohen & Arbely 2016).

Alternativ würde die Etablierung einer stabilen Zelllinie, welche Synthetase und die multiplen Kopien (bis zu 20) der tRNA basal exprimiert, Abhilfe für die inhomogene Transfektion schaffen. Dieser Ansatz wurde erfolgreich für HEK293- (Elsässer *et al.* 2016) und CHO-Zellen (F. Tian *et al.* 2014) verfolgt und erlaubte die Expression von Antikörpern inkl. nichtkanonischer Aminosäuren von $m > 1 \text{ g/L}$. Im bestmöglichen Fall würde die Expression der einzelnen Bestandteile unter der Kontrolle von verschiedenen starken, induzierbaren Promotoren stehen, so dass über die Konzentration der Induktoren der Expressionsgrad individuell gesteuert werden könnte. Da die Expression von Volllängenprotein inklusive artifiziellem Substrat primär von der intrazellulären tRNA-Konzentration abhängt (Schmied *et al.* 2014), wäre eine entsprechende Kontrolle wünschenswert. Im hier verwendeten System ist dies nur durch Variation der transfizierten DNA-Menge (Standard: $\text{ChR}_{\text{TAG}} : \text{tRNA}_{\text{CUA}}$ (kodiert für zwei Kopien) : $\text{aaRS}_{\text{azF}} = 10 : 10 : 1$) möglich und könnte erheblich von den individuellen Transfektionsbedingungen abhängen.

Um die Transfektion von tierischen Zellen mit Fremd-DNA zu erhöhen, wurden eine Reihe von Viren als Mediatoren (Transduktion) getestet. Neben Lentiviren (Shen *et al.* 2011), Adenoviren (Kita *et al.* 2016) und Adeno-assoziierten Viren (Ernst *et al.* 2016) scheinen besonders Baculoviren (Chatterjee *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2017) aufgrund ihrer großen DNA-Transportkapazität ($> 30 \text{ kbp}$) vielversprechend zu sein. In allen Fällen wurde eine höhere Ausbeute der Mutanten mit inkorporierter unnatürlicher Aminosäure als mit konventionellen Transfektionsmethoden erzielt.

Da die mit azF beladene tRNA_{CUA} immer mit den entsprechenden Freisetzungsfaktoren um die UAG-Bindestelle auf der mRNA konkurrieren muss, könnte eine geringere Bindungsaffinität des Translationsterminators eine höhere Suppressionseffizienz erlauben. Durch entsprechende Mutationen des eukaryotischen *release factor 1* (eRF1), welcher neben Amber auch Ochre- und Opal-Codons erkennt (Konecki *et al.* 1977), konnte eine 17 - 20fache Ausbeutensteigerung gegenüber dem wildtypischen eRF1 erzielt werden (Schmied *et al.* 2014).

Als weitere Möglichkeit wäre der Wechsel zu einem anderen eukaryotischen Expressionswirt wie *Pichia pastoris* (Young *et al.* 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Deiters *et al.* 2003) oder *Drosophila melanogaster*-Schneider-2-Zellen (Mukai, Wakiyama *et al.* 2010) denkbar, in welchen ChRs exprimierbar sind bzw. wären und bereits orthogonale Paare für die Inkorporation von azF

existieren. Im Gegensatz zu der einfachen und schnellen transienten Transfektion von tierischen Säugerzellen mit Vektor-DNA, erfordert die Proteinproduktion in den Hefe- und Insektenzellen die stabile Integration der Ziel-DNA ins Genom, was das Prozedere langwieriger gestaltet und für jede Mutante einzeln wiederholt werden müsste.

5. Bibliographie

- Anders, K. & Essen, L.-O., 2015. The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Current Opinion in Structural Biology*, 35, pp.7–16.
- Andrews, S.S. & Boxer, S.G., 2000. Vibrational Stark Effects of Nitriles I. Methods and Experimental Results. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(51), pp.11853–11863.
- Appleton, E. V., 1945. Departure of Long-Wave Solar Radiation from Black-Body Intensity. *Nature*, 156(3966), pp.534–535.
- Aton, B. *et al.*, 1977. Resonance Raman Studies of the Purple Membrane. *Biochemistry*, 16(13), pp.2995–2999.
- Avelar, G.M. *et al.*, 2014. A Rhodopsin-Guanylyl Cyclase Gene Fusion Functions in Visual Perception in a Fungus. *Current Biology*, 24(11), pp.1234–1240.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A., 1986. In Vivo Half-Life of a Protein Is a Function of Amino-Terminal Residue. *Science*, 234(4773), pp.179–186.
- Backliwal, G. *et al.*, 2008. Valproic Acid: A Viable Alternative to Sodium Butyrate for Enhancing Protein Expression in Mammalian Cell Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(1), pp.182–189.
- Baker, N.A. *et al.*, 2001. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), pp.10037–10041.
- Balashov, S.P. *et al.*, 2005. Xanthorhodopsin: A Proton Pump with a Light-Harvesting Carotenoid Antenna. *Science*, 309(5743), pp.2061–2064.
- Bamann, C. *et al.*, 2008. Spectral Characteristics of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 and Its Implication for Channel Function. *Journal of Molecular Biology*, 375(3), pp.686–694.
- Bamann, C. *et al.*, 2010. Structural Guidance of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 by an Interhelical Hydrogen Bond. *Biochemistry*, 49(2), pp.267–278.
- Bare, G.H., Alben, J.O. & Bromberg, P.A., 1975. Sulfhydryl Groups in Hemoglobin. A New Molecular Probe at the $\alpha_1\beta_1$ Interface Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 14(8), pp.1578–1583.
- Barends, T.R.M. *et al.*, 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, 459(7249), pp.1015–1018.
- Bas, D.C., Rogers, D.M. & Jensen, J.H., 2008. Very fast prediction and rationalization of pK_a values for protein-ligand complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(3), pp.765–783.

- Bazewicz, C.G. *et al.*, 2012. Expanding the Utility of 4-Cyano-L-Phenylalanine As a Vibrational Reporter of Protein Environments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(35), pp.10824–10831.
- Bazewicz, C.G. *et al.*, 2013. Sensitive, Site-Specific, and Stable Vibrational Probe of Local Protein Environments: 4-Azidomethyl-L-Phenylalanine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(30), pp.8987–8993.
- Becker-Baldus, J. *et al.*, 2015. Enlightening the photoactive site of channelrhodopsin-2 by DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), pp.9896–9901.
- Beckmann, M. & Hegemann, P., 1991. In Vitro Identification of Rhodopsin in the Green Alga *Chlamydomonas*. *Biochemistry*, 30(15), pp.3692–3697.
- Béjà, O. *et al.*, 2000. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science*, 289(5486), pp.1902–1906.
- Béjà, O. *et al.*, 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411(6839), pp.786–789.
- van den Berg, R. *et al.*, 1990. Subpicosecond resonance Raman spectra of the early intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, 58(1), pp.135–141.
- Berndt, A. *et al.*, 2009. Bi-stable neural state switches. *Nature Neuroscience*, 12(2), pp.229–234.
- Berndt, A. *et al.*, 2011. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), pp.7595–7600.
- Berndt, A., 2011. Mechanismus und anwendungsbezogene Optimierung von Channelrhodopsin-2. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Berndt, A. *et al.*, 2010. Two Open States with Progressive Proton Selectivities in the Branched Channelrhodopsin-2 Photocycle. *Biophysical Journal*, 98(5), pp.753–761.
- Berthold, P. *et al.*, 2008. Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in *Chlamydomonas* by Immediate Light-Induced Depolarization. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(6), pp.1665–1677.
- Bertie, J.E., Ahmed, M.K. & Eysel, H.H., 1989. Infrared Intensities of Liquids. 5. Optical and Dielectric Constants, Integrated Intensities, and Dipole Moment Derivatives of H₂O and D₂O at 22 °C. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(6), pp.2210–2218.
- Bertram, G. *et al.*, 2001. Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology*, 147, pp.255–269.
- Bianco, A. *et al.*, 2012. Expanding the genetic code of *Drosophila melanogaster*. *Nature Chemical Biology*, 8(9), pp.748–750.

- Biasini, M. *et al.*, 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), pp.W252–W258.
- Blight, S.K. *et al.*, 2004. Direct charging of tRNA_{CUA} with pyrrolysine *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, 431(7006), pp.333–335.
- Blobel, G. & Dobbenstein, B., 1975. TRANSFER OF PROTEINS ACROSS MEMBRANES I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains On Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma. *Journal of Cell Biology*, 67, pp.835–851.
- Bloem, R. *et al.*, 2012. Ligand Binding Studied by 2D IR Spectroscopy Using the Azidohomoalanine Label. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(46), pp.13705–13712.
- Blom, N. *et al.*, 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), pp.1633–1649.
- Bogomolni, R.A. & Spudich, J.L., 1982. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(20), pp.6250–6254.
- Bondar, A.-N. *et al.*, 2005. Tuning of Retinal Twisting in Bacteriorhodopsin Controls the Directionality of the Early Photocycle Steps. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(31), pp.14786–14788.
- Boxer, S.G., 2009. Stark Realities. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(10), pp.2972–2983.
- Boyden, E.S. *et al.*, 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), pp.1263–1268.
- Braun, F.-J. & Hegemann, P., 1999. Two Light-Activated Conductances in the Eye of the Green Alga *Volvox carteri*. *Biophysical Journal*, 76(3), pp.1668–78.
- Brown, B.A. *et al.*, 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), pp.18225–18230.
- Brudler, R. *et al.*, 2003. Identification of a New Cryptochrome Class. *Molecular Cell*, 11(1), pp.59–67.
- Bruun, S. *et al.*, 2015. Light–Dark Adaptation of Channelrhodopsin Involves Photoconversion between the all-*trans* and 13-*cis* Retinal Isomers. *Biochemistry*, 54(35), pp.5389–5400.
- Bruun, S., 2013. Resonance Raman spectroscopy on microbial rhodopsins. *Dissertation*. Technische Universität Berlin.
- Bruun, S. *et al.*, 2011. The chromophore structure of the long-lived intermediate of the C128T channelrhodopsin-2 variant. *FEBS Letters*, 585(24), pp.3998–4001.

- Bublitz, G.U. & Boxer, S.G., 1997. STARK SPECTROSCOPY: Applications in Chemistry, Biology, and Materials Science. *Annual Review of Physical Chemistry*, 48(1), pp.213–242.
- Butler, W.L. *et al.*, 1959. DETECTION, ASSAY, AND PRELIMINARY PURIFICATION OF THE PIGMENT CONTROLLING PHOTORESPONSIVE DEVELOPMENT OF PLANTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45(12), pp.1703–1708.
- Cellitti, S.E. *et al.*, 2008. *In vivo* Incorporation of Unnatural Amino Acids to Probe Structure, Dynamics, and Ligand Binding in a Large Protein by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(29), pp.9268–9281.
- Chaigneau, E. *et al.*, 2016. Two-Photon Holographic Stimulation of ReaChR. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(234).
- Chatterjee, A. *et al.*, 2013. Efficient viral delivery system for unnatural amino acid mutagenesis in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), pp.11803–11808.
- Chen, M., Chory, J. & Fankhauser, C., 2004. Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annual Review of Genetics*, 38(1), pp.87–117.
- Chen, P.R. *et al.*, 2009. A Facile System for Encoding Unnatural Amino Acids in Mammalian Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(22), pp.4052–4055.
- Chen, X. & Spudich, J.L., 2002. Demonstration of 2:2 Stoichiometry in the Functional SRI–HtrI Signaling Complex in *Halobacterium* Membranes by Gene Fusion Analysis. *Biochemistry*, 41(12), pp.3891–3896.
- Chen, Y. *et al.*, 2017. Heritable expansion of the genetic code in mouse and zebrafish. *Cell Research*, 27(2), pp.294–297.
- Childs, R.F., Shaw, G.S. & Wasylishen, R.E., 1987. Solid-state Studies of Some Retinal Iminium Salts and Related Compounds: Evidence for a 6-s-Trans Conformation. *Journal of the American Chemical Society*, 109, pp.5362–5366.
- Chin, J.W. *et al.*, 2002. Addition of *p*-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), pp.9026–9027.
- Chin, J.W. *et al.*, 2003. An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science*, 301(5635), pp.964–967.
- Choi, J.H. & Lee, S.Y., 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), pp.625–635.
- Choi, J.H., Raleigh, D. & Cho, M., 2011. Azido Homoalanine is a Useful Infrared Probe for Monitoring Local Electrostatics and Side-Chain Solvation in Proteins. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(17), pp.2158–2162.
- Chowdhury, A. *et al.*, 2012. MistC and TarCF as fusion protein partners for functional expression of the cannabinoid receptor 2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 83(2),

pp.128–134.

Christie, A. & Butler, M., 1994. Growth and Metabolism of a Murine Hybridoma in Cultures Containing Glutamine-Based Dipeptides. *Life Technologies Focus*, 16(1), pp.9–13.

Christie, J.M. *et al.*, 1998. *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science*, 282(5394), pp.1698–1701.

Christie, J.M., 2007. Phototropin Blue-Light Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58, pp.21–45.

Christie, J.M. *et al.*, 2012. Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science*, 335(6075), pp.1492–1496.

Chung, K. *et al.*, 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449), pp.332–337.

Chung, K. & Deisseroth, K., 2013. CLARITY for mapping the nervous system. *Nature Methods*, 10(6), pp.508–513.

Cohen, S. & Arbely, E., 2016. Single-Plasmid-Based System for Efficient Noncanonical Amino Acid Mutagenesis in Cultured Mammalian Cells. *ChemBioChem*, 17(11), pp.1008–1011.

Coin, I. *et al.*, 2013. Genetically Encoded Chemical Probes in Cells Reveal the Binding Path of Urocortin-I to CRF Class B GPCR. *Cell*, 155(6), pp.1258–1269.

Cornish, V.W. *et al.*, 1994. Site-specific incorporation of biophysical probes into proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), pp.2910–2914.

Cronin, T.W., Caldwell, R.L. & Marshall, J., 2001. Tunable colour vision in a mantis shrimp. *Nature*, 411(6837), pp.547–548.

Cronin, T.W. & Marshall, N.J., 1989. A retina with at least ten spectral types of photoreceptors in a mantis shrimp. *Nature*, 339, pp.137–140.

Crouch, R.K., Ebrey, T.G. & Govindjee, R., 1981. A Bacteriorhodopsin Analogue Containing the Retinal Nitroxide Free Radical. *Journal of the American Chemical Society*, 103(4), pp.7364–7366.

Curnow, P. & Booth, P.J., 2010. The Contribution of a Covalently Bound Cofactor to the Folding and Thermodynamic Stability of an Integral Membrane Protein. *Journal of Molecular Biology*, 403(4), pp.630–642.

Dai, G. *et al.*, 2010. Photoreaction Cycle of Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) from *Halobacterium salinarum* Expressed in *Escherichia coli*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3), pp.571–579.

Davis, S.J., Vener, A. V. & Vierstra, R.D., 1999. Bacteriophytochromes: Phytochrome-Like Photoreceptors from Nonphotosynthetic Eubacteria. *Science*, 286(5449), pp.2517–2520.

- Dawydow, A. *et al.*, 2014. Channelrhodopsin-2-XXL, a powerful optogenetic tool for low-light applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), pp.13972–13977.
- Deininger, W. *et al.*, 1995. Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor. *The EMBO Journal*, 14(23), pp.5849–5858.
- Deiters, A. *et al.*, 2003. Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), pp.11782–11783.
- Deiters, A., Geierstanger, B.H. & Schultz, P.G., 2005. Site-Specific in vivo Labeling of Proteins for NMR Studies. *ChemBioChem*, 6(1), pp.55–58.
- Derelle, E. *et al.*, 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), pp.11647–11652.
- Dieterich, D.C. *et al.*, 2007. Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nature Protocols*, 2(3), pp.532–540.
- Dieterich, D.C. *et al.*, 2006. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), pp.9482–9487.
- Doi, S. *et al.*, 2017. An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 7, p.41879.
- Doi, S. *et al.*, 2015. Structural and functional roles of the N- and C-terminal extended modules in channelrhodopsin-1. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14(9), pp.1628–1636.
- Drabkin, H.J. & RajBhandary, U.L., 1985. Expression *in Vivo* of a Mutant Human Initiator tRNA Gene in Mammalian Cells using Simian Virus 40 Vector. *Journal of Biological Chemistry*, 9(10), pp.5588–5595.
- DuBridge, R.B. *et al.*, 1987. Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. *Molecular and Cellular Biology*, 7(1), pp.379–387.
- Dulbecco, R. & Freeman, G., 1959. Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology*, 8, pp.396–397.
- Dumas, A. *et al.*, 2015. Designing logical codon reassignment – Expanding the chemistry in biology. *Chem. Sci.*, 6(1), pp.50–69.
- Dyall, L.K. & Kemp, J.E., 1967. THE INFRARED SPECTRA OF ARYL AZIDES. *Australian Journal of Chemistry*, 20(7), pp.1395–1402.
- Edman, K. *et al.*, 1999. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature*, 401(6755), pp.822–826.

- Ehlenbeck, S. *et al.*, 2002. Evidence for a Light-Induced H⁺ Conductance in the Eye of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical Journal*, 82(2), pp.740–51.
- Eisenhauer, K. *et al.*, 2012. In Channelrhodopsin-2 Glu-90 Is Crucial for Ion Selectivity and Is Deprotonated during the Photocycle. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), pp.6904–6911.
- Eisenhauer, K.D., 2016. MD-Simulationen zur Aufklärung des molekularen Reaktionsmechanismus von Channelrhodopsin-2. *Dissertation*. Ruhr-Universität Bochum.
- Eliash, T. *et al.*, 2013. Nitroxyl Radicals for Studying Electron Transfer. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(33), pp.8689–8692.
- Eliash, T. *et al.*, 2001. Specific Binding Sites for Cations in Bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, 81(2), pp.1155–62.
- Elsässer, S.J. *et al.*, 2016. Genetic code expansion in stable cell lines enables encoded chromatin modification. *Nature Methods*, 13(2), pp.158–164.
- Engel, B.D. *et al.*, 2015. Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *eLife*, 4(e04889).
- Erbguth, K. *et al.*, 2012. Bimodal Activation of Different Neuron Classes with the Spectrally Red-Shifted Channelrhodopsin Chimera C1V1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 7(10), p.e46827.
- Ernst, O.P. *et al.*, 2014. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1), pp.126–163.
- Ernst, O.P. *et al.*, 2008. Photoactivation of Channelrhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3), pp.1637–1643.
- Ernst, R.J. *et al.*, 2016. Genetic code expansion in the mouse brain. *Nature Chemical Biology*, 12(10), pp.776–778.
- Eyring, G. *et al.*, 1982. Assignment and Interpretation of Hydrogen Out-of-Plane Vibrations in the Resonance Raman Spectra of Rhodopsin and Bathorhodopsin. *Biochemistry*, 21(2), pp.384–393.
- Fafarman, A.T. *et al.*, 2006. Site-Specific Conversion of Cysteine Thiols into Thiocyanate Creates an IR Probe for Electric Fields in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 128(41), pp.13356–13357.
- Fafarman, A.T. & Boxer, S.G., 2010. Nitrile Bonds as Infrared Probes of Electrostatics in Ribonuclease S. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(42), pp.13536–13544.
- Fekkes, P. & Driessen, A.J.M., 1999. Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(1), pp.161–173.

- Feldbauer, K. *et al.*, 2009. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), pp.12317–12322.
- Feldman, M.F. *et al.*, 2005. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), pp.3016–3021.
- Ferrer, M. *et al.*, 2003. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 21(11), pp.1266–1267.
- Fisher, A.C. *et al.*, 2011. Production of Secretory and Extracellular N-Linked Glycoproteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), pp.871–881.
- Fleissner, M.R. *et al.*, 2009. Site-directed spin labeling of a genetically encoded unnatural amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), pp.21637–21642.
- Flitsch, S.L. & Khorana, H.G., 1989. Structural Studies on Transmembrane Proteins. 1. Model Study Using Bacteriorhodopsin Mutants Containing Single Cysteine Residues. *Biochemistry*, 28(19), pp.7800–7805.
- Foster, K.W. *et al.*, 1984. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311, pp.756–759.
- Foster, K.W. & Smyth, R.D., 1980. Light Antennas in Phototactic Algae. *Microbiological Reviews*, 44(4), pp.572–630.
- Fraczkiewicz, R. & Braun, W., 1998. Exact and Efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Areas and Their Gradients for Macromolecules. *Journal of Computational Chemistry*, 19(3), pp.319–333.
- Freedman, K.A. & Becker, R.S., 1986. Comparative Investigation of the Photoisomerization of the Protonated and Unprotonated *n*-Butylamine Schiff Bases of 9-*cis*-, 11-*cis*-, 13-*cis*-, and *all-trans*-Retinals. *Journal of the American Chemical Society*, 108(6), pp.1245–1251.
- Freeze, H.H. & Kranz, C., 2008. Endoglycosidase and Glycoamidase Release of N-Linked Glycans. In *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 8.15.1-8.15.26.
- Freier, E., Wolf, S. & Gerwert, K., 2011. Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in a membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), pp.11435–11439.
- Fukuda, M.N., Papermaster, D.S. & Hargrave, P.A., 1979. Rhodopsin Carbohydrate - STRUCTURE OF SMALL OLIGOSACCHARIDES ATTACHED AT TWO SITES NEAR THE NH₂ TERMINUS. *Journal of Biological Chemistry*, 254(17), pp.8201–8207.
- Furter, R., 1998. Expansion of the genetic code: Site-directed *p*-fluoro-phenylalanine incorporation in *Escherichia coli*. *Protein Science*, 7(2), pp.419–26.

- Gao, S. *et al.*, 2015. Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin CyclOp. *Nature Communications*, 6(8046).
- Gasser, C. *et al.*, 2014. Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), pp.8803–8808.
- van Geel, R. *et al.*, 2012. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), pp.392–398.
- Geibel, S. *et al.*, 2001. The Voltage-Dependent Proton Pumping in Bacteriorhodopsin Is Characterized by Optoelectric Behavior. *Biophysical Journal*, 81(4), pp.2059–2068.
- Van Gelder, R.N. & Sancar, A., 2005. Animal Cryptochromes. In W. R. Briggs & J. L. Spudich, eds. *Handbook of Photosensory Receptors*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 259–276.
- Getahun, Z. *et al.*, 2003. Using Nitrile-Derivatized Amino Acids as Infrared Probes of Local Environment. *Journal of the American Chemical Society*, 125(2), pp.405–411.
- Gfeller, D., Michielin, O. & Zoete, V., 2012. SwissSidechain: a molecular and structural database of non-natural sidechains. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp.D327–D332.
- Gluzman, Y., 1981. SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell*, 23(1), pp.175–182.
- Gomelsky, M. & Kaplan, S., 1998. AppA, a Redox Regulator of Photosystem Formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, Is a Flavoprotein. IDENTIFICATION OF A NOVEL FAD BINDING DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), pp.35319–35325.
- Gonda, D.K. *et al.*, 1989. Universality and Structure of the N-end Rule. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), pp.16700–16712.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruysschaert, J.-M., 1994. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes*. Springer US, pp. 405–450.
- Gossen, M. *et al.*, 1995. Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science*, 268(5218), pp.1766–1769.
- Govindjee, R. *et al.*, 1995. Effects of Substitution of Tyrosine 57 with Asparagine and Phenylalanine on the Properties of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 34(14), pp.4828–4838.
- Govorunova, E.G. *et al.*, 2013. Characterization of a Highly Efficient Blue-shifted Channelrhodopsin from the Marine Alga *Platymonas subcordiformis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), pp.29911–29922.
- Govorunova, E.G. *et al.*, 2004. *Chlamydomonas* Sensory Rhodopsins A and B: Cellular Content and Role in Photophobic Responses. *Biophysical Journal*, 86(4), pp.2342–2349.

- Govorunova, E.G. *et al.*, 2015. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science*, 349(6248), pp.647–650.
- Govorunova, E.G. *et al.*, 2011. New Channelrhodopsin with a Red-Shifted Spectrum and Rapid Kinetics from *Mesostigma viride*. *mBio*, 2(3), pp.e00115-11.
- Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A. & Spudich, J.L., 2016. *Proteomonas sulcata* ACR1: A Fast Anion Channelrhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 92(2), pp.257–263.
- Gradmann, D. *et al.*, 2011. Rectification of the Channelrhodopsin Early Conductance. *Biophysical Journal*, 101(5), pp.1057–1068.
- Graham, F.L. *et al.*, 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), pp.59–72.
- Greiner, A., 2015. CRISPR/Cas9 und Zinkfinger-Nukleasen für die gezielte Genstilllegung in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Greiner, A. *et al.*, 2017. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *The Plant Cell*, 29(10), pp.2498–2518.
- Greiss, S. & Chin, J.W., 2011. Expanding the Genetic Code of an Animal. *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), pp.14196–14199.
- Griffin Jr., E.A., Staknis, D. & Weitz, C.J., 1999. Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, 286(5440), pp.768–771.
- Grimm, C., 2014. Elektrophysiologische Untersuchung von neuen Kanalrhodopsinvarianten entwickelt für optogenetische Experimente mit rotem Licht. *Masterarbeit*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Grimm, C. *et al.*, 2017. Whole-cell Patch-clamp Recordings for Electrophysiological Determination of Ion Selectivity in Channelrhodopsins. *Journal of Visualized Experiments*, 123(e55497).
- Groenendijk, G.W.T., de Grip, W.J. & Daemen, F.J.M., 1979. Identification and Characterization of *syn*- and *anti*-isomers of retinaloximes. *Analytical Biochemistry*, 99(2), pp.304–310.
- Groenendijk, G.W.T., de Grip, W.J. & Daemen, F.J.M., 1980. Quantitative determination of retinals with complete retention of their geometric configuration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 617(3), pp.430–438.
- Grunbeck, A. *et al.*, 2012. Genetically Encoded Photo-cross-linkers Map the Binding Site of an Allosteric Drug on a G Protein-Coupled Receptor. *ACS Chemical Biology*, 7(6), pp.967–972.
- Gu, S. *et al.*, 2003. Precise Peptide Sequencing and Protein Quantification in the Human Proteome Through In Vivo Lysine-Specific Mass Tagging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(1), pp.1–7.

- Gunaydin, L.A. *et al.*, 2010. Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience*, 13(3), pp.387–392.
- Guo, H. *et al.*, 1998. Regulation of Flowering Time by *Arabidopsis* Photoreceptors. *Science*, 279(5355), pp.1360–1363.
- Guo, H. *et al.*, 2005. The phot LOV2 domain and its interaction with LOV1. *Biophysical Journal*, 89(1), pp.402–412.
- Guo, Y. *et al.*, 2016. Active Site Structure and Absorption Spectrum of Channelrhodopsin-2 Wild-type and C128T Mutant. *Chemical Science*, 7(6), pp.3879–3891.
- Gushchin, I. *et al.*, 2011. Active State of Sensory Rhodopsin II: Structural Determinants for Signal Transfer and Proton Pumping. *Journal of Molecular Biology*, 412(4), pp.591–600.
- Gushchin, I. *et al.*, 2015. Crystal structure of a light-driven sodium pump. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22, pp.390–395.
- Guzman, L.-M. *et al.*, 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), pp.4121–4130.
- Hahn, A. *et al.*, 2014. Ketoxime Coupling of *p*-Acetylphenylalanine at Neutral pH for Site-Directed Spin Labeling of Human Sulfite Oxidase. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(25), pp.7077–7084.
- Ham, R.G., 1963. AN IMPROVED NUTRIENT SOLUTION FOR DIPLOID CHINESE HAMSTER AND HUMAN CELL LINES. *Experimental Cell Research*, 29, pp.515–526.
- Hancock, S.M. *et al.*, 2010. Expanding the Genetic Code of Yeast for Incorporation of Diverse Unnatural Amino Acids via a Pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA Pair. *Journal of the American Chemical Society*, 132(42), pp.14819–14824.
- Hao, Z. *et al.*, 2011. A readily synthesized cyclic pyrrolysine analogue for site-specific protein “click” labeling. *Chemical Communications*, 47, pp.4502–4504.
- Harbison, G.S. *et al.*, 1984. Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-*cis*, 15-*syn* and all-*trans*, 15-*anti* retinal Schiff bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(6), pp.1706–1709.
- Hart, G.W. & West, C.M., 2009. Nucleocytoplasmic Glycosylation. In A. Varki *et al.*, eds. *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 171–182.
- Harz, H. & Hegemann, P., 1991. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. *Nature*, 351, pp.489–491.
- Harz, H., Nonnengässer, C. & Hegemann, P., 1992. The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 338(1283), pp.39–52.

- Hashimoto, K. *et al.*, 2010. Low-Temperature FTIR Study of *Gloeobacter* Rhodopsin: Presence of Strongly Hydrogen-Bonded Water and Long-Range Structural Protein Perturbation upon Retinal Photoisomerization. *Biochemistry*, 49(15), pp.3343–3350.
- Hegemann, P., 2008. Algal Sensory Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), pp.167–189.
- Hegemann, P., Ehlenbeck, S. & Gradmann, D., 2005. Multiple Photocycles of Channelrhodopsin. *Biophysical Journal*, 89(6), pp.3911–3918.
- Hochbaum, D.R. *et al.*, 2014. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nature Methods*, 11(8), pp.825–833.
- Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. & Engelhard, M., 1999. Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 442(2–3), pp.198–202.
- Hontani, Y., Marazzi, M., *et al.*, 2017. Reaction dynamics of the chimeric channelrhodopsin C1C2. *Scientific Reports*, 7(7217).
- Hontani, Y., Broser, M., *et al.*, 2017. The femtosecond-to-second photochemistry of red-shifted fast-closing anion channelrhodopsin PsACR1. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(45), pp.30402–30409.
- van der Horst, G.T.J. *et al.*, 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), pp.627–630.
- Hou, B. *et al.*, 2001. Ultrafast Spectroscopy of the Protonated Schiff Bases of Free and C₁₃=C₁₄ Locked Retinals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(29), pp.7042–7048.
- Hou, S.-Y. *et al.*, 2012. Diversity of *Chlamydomonas* Channelrhodopsins. *Photochemistry and Photobiology*, 88(1), pp.119–128.
- Hsiao, P.-Y. *et al.*, 2015. Non-invasive manipulation of *Drosophila* behavior by two-photon excited red-activatable channelrhodopsin. *Biomedical Optics Express*, 6(11), pp.4344–4352.
- Hughes, J. *et al.*, 1997. A prokaryotic phytochrome. *Nature*, 386(6626), pp.663–663.
- Hulstrom, R., Bird, R. & Riordan, C., 1985. Spectral solar irradiance data sets for selected terrestrial conditions. *Solar Cells*, 15(4), pp.365–391.
- Ihara, K. *et al.*, 1999. Evolution of the Archaeal Rhodopsins: Evolution Rate Changes by Gene Duplication and Functional Differentiation. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), pp.163–174.
- Inagaki, H.K. *et al.*, 2014. Optogenetic control of *Drosophila* using a red-shifted channelrhodopsin reveals experience-dependent influences on courtship. *Nature Methods*, 11(3), pp.325–32.
- Inaguma, A. *et al.*, 2015. Chimeras of Channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii*

- Exhibit Distinctive Light-induced Structural Changes from Channelrhodopsin-2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), pp.11623–11634.
- Inoue, K. *et al.*, 2013. A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nature Communications*, 4(1678).
- Inoue, K. *et al.*, 2016. A natural light-driven inward proton pump. *Nature Communications*, 7(13415).
- Iraha, F. *et al.*, 2010. Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase–tRNA^{Tyr} pair by the archaeal tyrosine pair in *Escherichia coli* for genetic code expansion. *Nucleic Acids Research*, 38(11), pp.3682–3691.
- Iseki, M. *et al.*, 2002. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Englena gracilis*. *Nature*, 415(6875), pp.1047–1051.
- Ishizuka, T. *et al.*, 2006. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neuroscience Research*, 54(2), pp.85–94.
- Italia, J.S., Addy, P.S., *et al.*, 2017. An orthogonalized platform for genetic code expansion in both bacteria and eukaryotes. *Nature Chemical Biology*, 13(4), pp.446–450.
- Italia, J.S., Zheng, Y., *et al.*, 2017. Expanding the genetic code of mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), pp.555–562.
- Ito, S. *et al.*, 2014. Water-Containing Hydrogen-Bonding Network in the Active Center of Channelrhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, 136(9), pp.3475–3482.
- Izard, J.W. & Kendall, D.A., 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Molecular Microbiology*, 13(5), pp.765–773.
- Jiang, Z. *et al.*, 1999. Bacterial Photoreceptor with Similarity to Photoactive Yellow Protein and Plant Phytochromes. *Science*, 285(5426), pp.406–409.
- Jo, H. *et al.*, 2010. Selective Incorporation of Nitrile-Based Infrared Probes into Proteins via Cysteine Alkylation. *Biochemistry*, 49(49), pp.10354–10356.
- Joh, N.H. *et al.*, 2008. Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature*, 453(7199), pp.1266–1270.
- Johnson, D.B.F. *et al.*, 2011. RF1 knockout allows ribosomal incorporation of unnatural amino acids at multiple sites. *Nature Chemical Biology*, 7(11), pp.779–786.
- Jung, K.H., Trivedi, V.D. & Spudich, J.L., 2003. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Molecular Microbiology*, 47(6), pp.1513–1522.
- Kahaki, F.A. *et al.*, 2014. High Overexpression and Purification of Optimized Bacterio-Op sin from *Halobacterium Salinarum* R1 in *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(4),

- pp.1558–1571.
- Kamiya, M. *et al.*, 2013. Structural and spectral characterizations of C1C2 channelrhodopsin and its mutants by molecular simulations. *Chemical Physics Letters*, 556, pp.266–271.
- Kao, F.-T. & Puck, T.T., 1968. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS, VII. INDUCTION AND ISOLATION OF NUTRITIONAL MUTANTS IN CHINESE HAMSTER CELLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 60(4), pp.1275–1281.
- Kao, F.-T. & Puck, T.T., 1967. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS. IV. PROPERTIES OF CHINESE HAMSTER CELL MUTANTS WITH RESPECT TO THE REQUIREMENT FOR PROLINE. *Genetics*, 55, pp.513–524.
- Karnik, S.S. *et al.*, 1988. Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(22), pp.8459–8463.
- Kateriya, S., 2004. Identification, Expression and Characterization of Archaeal-Type Opsins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dissertation*. Universität Regensburg.
- Kateriya, S. *et al.*, 2004. “Vision” in Single-Celled Algae. *News in Physiological Sciences*, 19(3), pp.133–137.
- Kato, H.E., Kamiya, M., *et al.*, 2015. Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nature Communications*, 6(1), p.7177.
- Kato, H.E. *et al.*, 2012. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482(7385), pp.369–74.
- Kato, H.E., Inoue, K., *et al.*, 2015. Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump. *Nature*, 521(7550), pp.48–53.
- Kaufman, R.J., 1985. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(3), pp.689–693.
- Kaufmann, J.C.D. *et al.*, 2017. Proton transfer reactions in the red light-activatable channelrhodopsin variant ReaChR and their relevance for its function. *Journal of Biological Chemistry*, 292(34), pp.14205–14216.
- Kaushal, S., Ridge, K.D. & Khorana, H.G., 1994. Structure and function in rhodopsin: The role of asparagine-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9), pp.4024–4028.
- Kawanabe, A. & Kandori, H., 2009. Photoreactions and Structural Changes of *Anabaena* Sensory Rhodopsin. *Sensors*, 9(12), pp.9741–9804.
- Kefala, G. *et al.*, 2007. Application of Mistic to improving the expression and membrane

- integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 8(4), pp.167–172.
- Kianianmomeni, A. *et al.*, 2009. Channelrhodopsins of *Volvox carteri* Are Photochromic Proteins That Are Specifically Expressed in Somatic Cells under Control of Light, Temperature, and the Sex Inducer. *PLANT PHYSIOLOGY*, 151(1), pp.347–366.
- Kiick, K.L. *et al.*, 2002. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), pp.19–24.
- Kim, H. & Cho, M., 2013. Infrared Probes for Studying the Structure and Dynamics of Biomolecules. *Chemical Reviews*, 113(8), pp.5817–5847.
- Kirsch, T., 2007. Funktionelle Expression von Channelrhodopsin 2 (ChR2) in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* und biophysikalische Charakterisierung. *Dissertation*. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Kiser, P.D., Golczak, M. & Palczewski, K., 2014. Chemistry of the Retinoid (Visual) Cycle. *Chemical Reviews*, 114(1), pp.194–232.
- Kita, A. *et al.*, 2016. Adenovirus vector-based incorporation of a photo-cross-linkable amino acid into proteins in human primary cells and cancerous cell lines. *Scientific Reports*, 6(36946).
- Kitajima-Ihara, T. *et al.*, 2008. *Salinibacter* sensory rhodopsin: Sensory rhodopsin I-like protein from a eubacterium. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp.23533–23541.
- Klapoetke, N.C. *et al.*, 2014. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods*, 11(3), pp.338–46.
- Klar, T. *et al.*, 2007. Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and Functional Analysis of its Complex with a Folate Light Antenna. *Journal of Molecular Biology*, 366, pp.954–964.
- Kleinlogel, S., Terpitz, U., *et al.*, 2011. A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins. *Nature Methods*, 8(12), pp.1083–1088.
- Kleinlogel, S., Feldbauer, K., *et al.*, 2011. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nature Neuroscience*, 14(4), pp.513–8.
- Köhler, C., Sullivan, E.L. & RajBhandary, U.L., 2004. Complete set of orthogonal 21st aminoacyl-tRNA synthetase-amber, ochre and opal suppressor tRNA pairs: concomitant suppression of three different termination codons in an mRNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 32(21), pp.6200–6211.
- Kolbe, M. *et al.*, 2000. Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin at 1.8 Å Resolution. *Science*, 288(5470), pp.1390–1396.
- Konecki, D.R. *et al.*, 1977. Characterization of Reticulocyte Release Factor. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 252(13), pp.4514–4520.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985. Assembly of Asparagine-linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), pp.631–664.
- Kouyama, T. *et al.*, 2010. Crystal Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *Journal of Molecular Biology*, 396(3), pp.564–579.
- Kowarik, M., Young, N.M., *et al.*, 2006. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *The EMBO Journal*, 25(9), pp.1957–1966.
- Kowarik, M., Numao, S., *et al.*, 2006. N-Linked Glycosylation of Folded Proteins by the Bacterial Oligosaccharyltransferase. *Science*, 314(5802), pp.1148–1150.
- Kozinski, M., Garrett-Roe, S. & Hamm, P., 2008. 2D-IR Spectroscopy of the Sulfhydryl Band of Cysteines in the Hydrophobic Core of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(25), pp.7645–7650.
- Krause, B.S. *et al.*, 2017. Complex Photochemistry within the Green-Absorbing Channelrhodopsin ReaChR. *Biophysical Journal*, 112(6), pp.1166–1175.
- Krause, N. *et al.*, 2013. Structural differences between the closed and open states of channelrhodopsin-2 as observed by EPR spectroscopy. *FEBS Letters*, 587(20), pp.3309–3313.
- Krause, N., 2016. *Structural rearrangements upon opening of Channelrhodopsin-2*. Freie Universität Berlin.
- Kreimer, G., 2009. The green algal eyespot apparatus: A primordial visual system and more? *Current Genetics*, 55(1), pp.19–43.
- Kuhne, J. *et al.*, 2015. Early Formation of the Ion-Conducting Pore in Channelrhodopsin-2. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(16), pp.4953–4957.
- Kuhne, J., 2016. Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Channelrhodopsin-2 mithilfe von zeitaufgelöster FTIR- und Raman-Spektroskopie. *Dissertation*. Ruhr-Universität Bochum.
- Kutta, R.J. *et al.*, 2017. Vertebrate Cryptochromes are Vestigial Flavoproteins. *Scientific Reports*, 7(44906).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp.680–685.
- Lajoie, M.J. *et al.*, 2013. Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions. *Science*, 342(6156), pp.357–360.
- Lamarche, L.B. *et al.*, 2017. Purification and Characterization of RhoPDE, a

- Retinylidene/Phosphodiesterase Fusion Protein and Potential Optogenetic Tool from the Choanoflagellate *Salpingoeca rosetta*. *Biochemistry*, 56(43), pp.5812–5822.
- Lamparter, T., Esteban, B. & Hughes, J., 2001. Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 purification, assembly, and quaternary structure. *European Journal of Biochemistry*, 268(17), pp.4720–4730.
- Lanyi, J.K., 2006. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(8), pp.1012–1018.
- Lee, H.S. *et al.*, 2009. Genetic Incorporation of a Small, Environmentally Sensitive, Fluorescent Probe into Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(36), pp.12921–12923.
- Lee, K.A. *et al.*, 2015. Mistic-fused expression of algal rhodopsins in *Escherichia coli* and its photochemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(9), pp.1694–1703.
- Lei, S.-P. *et al.*, 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* Gene and Its Product Pectate Lyase. *Journal of Bacteriology*, 169(9), pp.4379–4383.
- Lerner, M.G. & Carlson, H.A., 2006. APBS plugin for PyMOL.
- Lewis, N.E. *et al.*, 2013. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nature Biotechnology*, 31(8), pp.759–765.
- Li, F. *et al.*, 2013. Expanding the Genetic Code for Photoclick Chemistry in *E. coli*, Mammalian Cells, and *A. thaliana*. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(37), pp.9700–9704.
- Li, H. *et al.*, 2014. Role of a Helix B Lysine Residue in the Photoactive Site in Channelrhodopsins. *Biophysical Journal*, 106(8), pp.1607–1617.
- Li, H., Robertson, A.D. & Jensen, J.H., 2005. Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein pK_a Values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), pp.704–721.
- Li, H. & Thomas, G.J., 1991. Studies of virus structure by Raman spectroscopy. Cysteine conformation and sulfhydryl interactions in proteins and viruses. 1. Correlation of the Raman sulfur-hydrogen band with hydrogen bonding and intramolecular geometry in model compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 113(2), pp.456–462.
- Li, X. *et al.*, 2005. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), pp.17816–17821.
- Lin, C. *et al.*, 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), pp.2686–2690.
- Lin, J.Y. *et al.*, 2009. Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved

- Properties and Kinetics. *Biophysical Journal*, 96(5), pp.1803–1814.
- Lin, J.Y. *et al.*, 2013. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nature Neuroscience*, 16(10), pp.1499–508.
- Link, A.J. *et al.*, 2006. Discovery of aminoacyl-tRNA synthetase activity through cell-surface display of noncanonical amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), pp.10180–10185.
- Link, A.J. & Tirrell, D.A., 2003. Cell Surface Labeling of *Escherichia coli* via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), pp.11164–11165.
- Lipkin, J.S. *et al.*, 2011. Modulating Accidental Fermi Resonance: What a Difference a Neutron Makes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(14), pp.1672–1676.
- Liu, C.C. & Schultz, P.G., 2010. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), pp.413–444.
- Liu, W. *et al.*, 2007. Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nature Methods*, 4(3), pp.239–244.
- Lizak, C. *et al.*, 2011. N-Linked Glycosylation of Antibody Fragments in *Escherichia coli*. *Bioconjugate Chemistry*, 22(3), pp.488–496.
- Lórenz-Fonfría, V.A. *et al.*, 2014. Changes in the hydrogen-bonding strength of internal water molecules and cysteine residues in the conductive state of channelrhodopsin-1. *The Journal of Chemical Physics*, 141(22), p.22D507.
- Lórenz-Fonfría, V.A., Schultz, B.-J., *et al.*, 2015. Pre-Gating Conformational Changes in the ChETA Variant of Channelrhodopsin-2 Monitored by Nanosecond IR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 137(5), pp.1850–1861.
- Lórenz-Fonfría, V.A., Bamann, C., *et al.*, 2015. Temporal evolution of helix hydration in a light-gated ion channel correlates with ion conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), pp.E5796–E5804.
- Lórenz-Fonfría, V.A. *et al.*, 2013. Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), pp.E1273–E1281.
- Lórenz-Fonfría, V.A. & Heberle, J., 2014. Channelrhodopsin unchained: Structure and mechanism of a light-gated cation channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5), pp.626–642.
- Luck, M. *et al.*, 2012. A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp.40083–40090.

- Luck, M., 2017. Erstcharakterisierung von Histidinkinase-Rhodopsinen aus einzelligen Grünalgen. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Luck, M. *et al.*, 2015. Photochemical chromophore isomerization in histidine kinase rhodopsin HKR1. *FEBS Letters*, 589(10), pp.1067–1071.
- Luck, M. & Hegemann, P., 2017. The two parallel photocycles of the *Chlamydomonas* sensory photoreceptor histidine kinase rhodopsin 1. *Journal of Plant Physiology*, 217, pp.77–84.
- Ludlam, C.F.C. *et al.*, 1995. Site-Directed Isotope Labeling and ATR-FTIR Difference Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: The Peptide Carbonyl Group of Tyr 185 Is Structurally Active During the bR-N Transition. *Biochemistry*, 29(34), pp.2–6.
- Luecke, H. *et al.*, 2008. Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), pp.16561–16565.
- Luecke, H. *et al.*, 1999a. Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution. *Science*, 286(5438), pp.255–260.
- Luecke, H. *et al.*, 1999b. Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 291(4), pp.899–911.
- Ma, J. *et al.*, 2015. Site-Specific Infrared Probes of Proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 66(1), pp.357–377.
- Maeda, A. *et al.*, 1991. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTRAL STUDIES ON THE SCHIFF BASE MODE OF ALL-*trans* BACTERIORHODOPSIN AND ITS PHOTOINTERMEDIATES, K AND L. *Photochemistry and Photobiology*, 54(6), pp.911–921.
- Marblestone, A.H. *et al.*, 2013. Physical Principles for Scalable Neural Recording. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 7(137).
- Markwardt, M.L. *et al.*, 2011. An Improved Cerulean Fluorescent Protein with Enhanced Brightness and Reduced Reversible Photoswitching. *PLoS ONE*, 6(3), p.e17896.
- Marshall, J. & Oberwinkler, J., 1999. The colorful world of the mantis shrimp. *Nature*, 401(6756), pp.873–874.
- Marti, T., Otto, H., *et al.*, 1991. Bacteriorhodopsin Mutants Containing Single Substitutions of Serine or Threonine Residues Are All Active in Proton Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), pp.6919–6927.
- Marti, T., Rösselet, S.J., *et al.*, 1991. The Retinylidene Schiff Base Counterion in Bacteriorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(28), pp.18674–18683.
- Masuda, S. & Bauer, C.E., 2002. AppA Is a Blue Light Photoreceptor that Antirepresses Photosynthesis Gene Expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, 110(5), pp.613–623.

- Matsui, Y. *et al.*, 2002. Specific Damage Induced by X-ray Radiation and Structural Changes in the Primary Photoreaction of Bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology*, 324(3), pp.469–481.
- Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y., 1977. TWO POSSIBLE ROLES OF BACTERIORHODOPSIN; A COMPARATIVE STUDY OF STRAINS OF *HALOBACTERIUM HALOBIUM* DIFFERING IN PIGMENTATION. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78(1), pp.237–243.
- Mehlhorn, J. *et al.*, 2013. A Set of Engineered *Escherichia coli* Expression Strains for Selective Isotope and Reactivity Labeling of Amino Acid Side Chains and Flavin Cofactors. *PLOS ONE*, 8(11), p.e79006.
- Melkonian, M. & Robenek, H., 1980. Eyespot Membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: A Freeze-Fracture Study. *Journal of Ultrastructure Research*, 72(1), pp.90–102.
- Meyer, C.K. *et al.*, 2000. Signaling States of Rhodopsin. RETINAL PROVIDES A SCAFFOLD FOR ACTIVATING PROTON TRANSFER SWITCHES. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), pp.19713–19718.
- Michel, H. & Oesterhelt, D., 1976. LIGHT-INDUCED CHANGES OF THE pH GRADIENT AND THE MEMBRANE POTENTIAL IN *H. HALOBIUM*. *FEBS Letters*, 65(2), pp.175–178.
- Miranda, M.R.M. *et al.*, 2009. The Photocycle and Proton Translocation Pathway in a Cyanobacterial Ion-Pumping Rhodopsin. *Biophysical Journal*, 96(4), pp.1471–1481.
- Mironova, O.S. *et al.*, 2005. Functional characterization of sensory rhodopsin II from *Halobacterium salinarum* expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 579(14), pp.3147–3151.
- Miroux, B. & Walker, J.E., 1996. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), pp.289–298.
- Mittelmeier, T.M. *et al.*, 2011. Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization. *Journal of Cell Biology*, 193(4), pp.741–753.
- Mizukami, T. *et al.*, 1993. Photoisomerization mechanism of the rhodopsin chromophore: picosecond photolysis of pigment containing 11-cis-locked eight-membered ring retinal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), pp.4072–4076.
- Moh, P.P., Fiamingo, F.G. & Alben, J.O., 1987. Conformational Sensitivity of β -93 Cysteine SH to Ligation of Hemoglobin Observed by FT-IR Spectroscopy. *Biochemistry*, 26(1963), pp.6243–6249.
- Mohrmann, H. *et al.*, 2016. Transient Conformational Changes of Sensory Rhodopsin II Investigated by Vibrational Stark Effect Probes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(19), pp.4383–4387.

- Molday, R.S. & MacKenzie, D., 1983. Monoclonal Antibodies to Rhodopsin: Characterization, Cross-Reactivity, and Application as Structural Probes. *Biochemistry*, 22(3), pp.653–660.
- Motto, M.G. *et al.*, 1980. Opsin Shifts in Bovine Rhodopsin and Bacteriorhodopsin. Comparison of Two External Point-Charge Models. *Journal of the American Chemical Society*, 102(27), pp.7947–7949.
- Muders, V., Kerruth, S., Lórenz-Fonfría, V.A., Bamann, C., *et al.*, 2014. Resonance Raman and FTIR spectroscopic characterization of the closed and open states of channelrhodopsin-1. *FEBS Letters*, 588(14), pp.2301–2306.
- Muders, V., Kerruth, S., Lórenz-Fonfría, V.A., Heberle, J., *et al.*, 2014. Spectroscopic Analysis of Channelrhodopsin and its Chromophore. *Biophysical Journal*, 106(2), p.653a.
- Mukai, T., Hayashi, A., *et al.*, 2010. Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Research*, 38(22), pp.8188–8195.
- Mukai, T., Wakiyama, M., *et al.*, 2010. Genetic encoding of non-natural amino acids in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells. *Protein Science*, 19(3), pp.440–448.
- Mullen, K.M. & van Stokkum, I.H.M., 2007. TIMP: An R package for modeling multi-way spectroscopic measurements. *Journal of Statistical Software*, 18(3), p.46.
- Müller, K.-H. & Plesser, T., 1991. Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. *European Biophysics Journal*, 19(5), pp.231–240.
- Müller, M. *et al.*, 2015. Light-Induced Helix Movements in Channelrhodopsin-2. *Journal of Molecular Biology*, 427(2), pp.341–349.
- Müller, M. *et al.*, 2011. Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 414(1), pp.86–95.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. In R. Wu, ed. *Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier Inc., pp. 335–350.
- Nack, M. *et al.*, 2012. Kinetics of proton release and uptake by channelrhodopsin-2. *FEBS Letters*, 586(9), pp.1344–1348.
- Nack, M. *et al.*, 2010. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(2), p.194.
- Nack, M. *et al.*, 2009. The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance Raman spectroscopy. *FEBS Letters*, 583(22), pp.3676–3680.
- Naganathan, S. *et al.*, 2013. Site-specific epitope tagging of G protein-coupled receptors by bioorthogonal modification of a genetically encoded unnatural amino acid. *Biochemistry*, 52(6), pp.1028–36.

- Nagel, G. *et al.*, 2002. Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science*, 296(5577), pp.2395–2398.
- Nagel, G. *et al.*, 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), pp.13940–13945.
- Nagel, G. *et al.*, 2005. Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology*, 15(24), pp.2279–2284.
- Nakanishi, K. *et al.*, 1980. An External Point-Charge Model for Bacteriorhodopsin To Account for Its Purple Color. *Journal of the American Chemical Society*, 102(27), pp.7945–7947.
- Neumann-Verhoeven, M.-K. *et al.*, 2013. Ultrafast Infrared Spectroscopy on Channelrhodopsin-2 Reveals Efficient Energy Transfer from the Retinal Chromophore to the Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 135(18), pp.6968–6976.
- Neumann, H., Peak-Chew, S.Y. & Chin, J.W., 2008. Genetically encoding N-acetyllysine in recombinant proteins. *Nature Chemical Biology*, 4(4), pp.232–234.
- Ngo, J.T. *et al.*, 2009. Cell-selective metabolic labeling of proteins. *Nature Chemical Biology*, 5(10), pp.715–717.
- Nguyen, D.P. *et al.*, 2009. Genetic Encoding and Labeling of Aliphatic Azides and Alkynes in Recombinant Proteins *via* a Pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA_{CUA} Pair and Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 131(25), pp.8720–8721.
- Nikolic, K. *et al.*, 2009. Photocycles of Channelrhodopsin-2. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1), pp.400–411.
- Nita-Lazar, M. *et al.*, 2004. The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology*, 15(4), pp.361–367.
- Nultsch, W., Throm, G. & von Rimscha, I., 1971. Phototaktische Untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in homokontinuierlicher Kultur. *Archiv für Mikrobiologie*, 80(4), pp.351–369.
- Nydegger, M.W., Dutta, S. & Cheatum, C.M., 2010. Two-dimensional infrared study of 3-azidopyridine as a potential spectroscopic reporter of protonation state. *The Journal of Chemical Physics*, 133(134506).
- Oesterhelt, D., 1998. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(4), pp.489–500.
- Oesterhelt, D., Meentzen, M. & Schuhmann, L., 1973. Reversible Dissociation of the Purple Complex in Bacteriorhodopsin and Identification of 13-*cis* and all-*trans*-Retinal as its Chromophores. *European Journal of Biochemistry*, 40(2), pp.453–463.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W., 1971. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of

- Halobacterium halobium*. *Nature: New Biology*, 233(39), pp.149–152.
- Ogren, J.I., Yi, A., Mamaev, S., Li, H., Lugtenburg, J., *et al.*, 2015. Comparison of the Structural Changes Occurring during the Primary Phototransition of Two Different Channelrhodopsins from *Chlamydomonas* Algae. *Biochemistry*, 54(2), pp.377–388.
- Ogren, J.I., Yi, A., Mamaev, S., Li, H., Spudich, J.L., *et al.*, 2015. Proton Transfers in a Channelrhodopsin-1 Studied by Fourier Transform Infrared (FTIR) Difference Spectroscopy and Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), pp.12719–12730.
- Ogren, J.I. *et al.*, 2014. Retinal Chromophore Structure and Schiff Base Interactions in Red-Shifted Channelrhodopsin-1 from *Chlamydomonas augustae*. *Biochemistry*, 53(24), pp.3961–3970.
- Oh, K.-I. *et al.*, 2008. β -Azidoalanine as an IR Probe: Application to Amyloid A β (16-22) Aggregation. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(33), pp.10352–10357.
- Ohki, M. *et al.*, 2016. Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), pp.6659–6664.
- Olsson, M.H.M. *et al.*, 2011. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), pp.525–537.
- Ong, S.-E. *et al.*, 2002. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), pp.376–386.
- Ong, S.-E., Mittler, G. & Mann, M., 2004. Identifying and quantifying *in vivo* methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nature Methods*, 1(2), pp.119–126.
- Opekarová, M. & Tanner, W., 2003. Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(1), pp.11–22.
- Oprian, D.D. *et al.*, 1987. Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), pp.8874–8878.
- Ouzounov, D.G. *et al.*, 2017. *In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. *Nature Methods*, 14(4), pp.388–390.
- Ozawa, S. *et al.*, 2009. Biochemical and Structural Studies of the Large Ycf4-Photosystem I Assembly Complex of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 21(8), pp.2424–2442.
- Packer, A.M. *et al.*, 2012. Two-photon optogenetics of dendritic spines and neural circuits. *Nature Methods*, 9(12), pp.1202–1205.

- Park, K.-H. *et al.*, 2013. Infrared Probes Based on Nitrile-Derivatized Prolines: Thermal Insulation Effect and Enhanced Dynamic Range. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(13), pp.2105–2110.
- Park, K.-S. *et al.*, 2006. Graded Regulation of the Kv2.1 Potassium Channel by Variable Phosphorylation. *Science*, 313(5789), pp.976–979.
- Perálvarez-Marín, A. *et al.*, 2004. Thr-90 Plays a Vital Role in the Structure and Function of Bacteriorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), pp.16403–16409.
- Petersen, T.N. *et al.*, 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), pp.785–786.
- Pettei, M.J. *et al.*, 1975. Identification of Retinal Isomers Isolated from Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 16(9), pp.1955–1959.
- Plazzo, A.P. *et al.*, 2012. Bioinformatic and Mutational Analysis of Channelrhodopsin-2 Protein Cation-conducting Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), pp.4818–4825.
- Pokorny, R. *et al.*, 2005. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(10), pp.935–938.
- Prakash, R. *et al.*, 2012. Two-photon optogenetic toolbox for fast inhibition, excitation and bistable modulation. *Nature Methods*, 9(12), pp.1171–1179.
- Prigge, M. *et al.*, 2012. Color-tuned Channelrhodopsins for Multiwavelength Optogenetics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp.31804–31812.
- Prigge, M., 2012. Über die elektrophysiologische Untersuchung und Entwicklung von farbverschobenen Kanalrhodopsinchimären aus der Grünalge *Volvox carteri*. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J. & Robinson, A., 1958. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS III. Long-Term Cultivation of Euploid Cells From Human and Animal Subjects. *The Journal of Experimental Medicine*, 108(6), pp.945–56.
- Racker, E. & Stoeckenius, W., 1974. Reconstitution of Purple Membrane Vesicles Catalyzing Light-driven Proton Uptake and Adenosine Triphosphate Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(2), pp.662–663.
- Radu, I. *et al.*, 2009. Conformational Changes of Channelrhodopsin-2. *Journal of the American Chemical Society*, 131(21), pp.7313–7319.
- Rajasethupathy, P. *et al.*, 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*, 526(7575), pp.653–659.
- Reeves, P.J. *et al.*, 2002. Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin

- with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), pp.13419–13424.
- Resnitzky, D. *et al.*, 1994. Acceleration of the G₁/S Phase Transition by Expression of Cyclins D1 and E with an Inducible System. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), pp.1669–79.
- Richards, R. & Dempski, R.E., 2017. Adjacent channelrhodopsin-2 residues within transmembranes 2 and 7 regulate cation selectivity and distribution of the two open states. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), pp.7314–7326.
- Rickgauer, J.P. & Tank, D.W., 2009. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), pp.15025–15030.
- Rio, D.C., Clark, S.G. & Tjian, R., 1985. A Mammalian Host-Vector System That Regulates Expression and Amplification of Transfected Genes by Temperature Induction. *Science*, 227(4682), pp.23–28.
- Ritter, E. *et al.*, 2013. Light-dark Adaptation of Channelrhodopsin C128T Mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp.10451–10458.
- Ritter, E. *et al.*, 2008. Monitoring Light-induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), pp.35033–35041.
- Ritz, T., Adem, S. & Schulten, K., 2000. A Model for Photoreceptor-Based Magnetoreception in Birds. *Biophysical Journal*, 78(2), pp.707–718.
- Rizzini, L. *et al.*, 2011. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science*, 332(6025), pp.103–106.
- Robinson, C. & Bolhuis, A., 2004. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1694(1–3), pp.135–147.
- Rodgers, C.T. & Hore, P.J., 2009. Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), pp.353–360.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M., 1986. Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The PEST Hypothesis. *Science*, 234(4774), pp.364–368.
- Ronzitti, E. *et al.*, 2017. Sub-millisecond optogenetic control of neuronal firing with two-photon holographic photoactivation of Chronos. *The Journal of Neuroscience*, pp.1246–17.
- Roosild, T.P. *et al.*, 2005. NMR Structure of Mistic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expression. *Science*, 307(5713), pp.1317–1321.
- Royant, A. *et al.*, 2001. X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution. *Proceedings of*
- 244

- the National Academy of Sciences*, 98(18), pp.10131–10136.
- Rozin, R. *et al.*, 2014. pH Dependence of Anabaena Sensory Rhodopsin: Retinal Isomer Composition, Rate of Dark Adaptation, and Photochemistry. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(30), pp.8995–9006.
- Ruffert, K. *et al.*, 2011. Glutamate residue 90 in the predicted transmembrane domain 2 is crucial for cation flux through channelrhodopsin 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(4), pp.737–743.
- Saiki, R.K. *et al.*, 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), pp.487–491.
- Sakamoto, K. *et al.*, 2002. Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 30(21), pp.4692–4699.
- Sattig, T. *et al.*, 2013. Light-Induced Movement of the Transmembrane Helix B in Channelrhodopsin-2. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(37), pp.9705–9708.
- Scharf, B. & Engelhard, M., 1994. Blue Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: Wavelength Regulation by Anions. *Biochemistry*, 33(21), pp.6387–6393.
- Scheib, U. *et al.*, 2015. The rhodopsin-guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling. *Science Signaling*, 8(389), p.rs8.
- Schenkl, S. *et al.*, 2005. Probing the Ultrafast Charge Translocation of Photoexcited Retinal in Bacteriorhodopsin. *Science*, 309(5736), pp.917–920.
- Schierle, C.F. *et al.*, 2003. The DsbA Signal Sequence Directs Efficient, Cotranslational Export of Passenger Proteins to the *Escherichia coli* Periplasm via the Signal Recognition Particle Pathway. *Journal of Bacteriology*, 185(19), pp.5706–5713.
- Schild, L.C. & Glauser, D.A., 2015. Dual color neural activation and behavior control with Chrimson and CoChR in *C. elegans*. *Genetics*, 200(4), pp.1029–1034.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A. & Gomelsky, M., 2005. The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. *Journal of Bacteriology*, 187(14), pp.4774–4781.
- Schmidt, M. *et al.*, 2006. Proteomic Analysis of the Eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* Provides Novel Insights into Its Components and Tactic Movements. *THE PLANT CELL ONLINE*, 18(8), pp.1908–1930.
- Schmidt, M.J. *et al.*, 2014. A Genetically Encoded Spin Label for Electron Paramagnetic Resonance Distance Measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 136(4), pp.1238–1241.
- Schmied, W.H. *et al.*, 2014. Efficient Multisite Unnatural Amino Acid Incorporation in

- Mammalian Cells via Optimized Pyrrolysyl tRNA Synthetase/tRNA Expression and Engineered eRF1. *Journal of the American Chemical Society*, 136(44), pp.15577–15583.
- Schmies, G., Chizhov, I. & Engelhard, M., 2000. Functional expression of His-tagged sensory rhodopsin I in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 466(1), pp.67–69.
- Schnedermann, C. *et al.*, 2016. Vibronic Dynamics of the Ultrafast all-*trans* to 13-*cis* Photoisomerization of Retinal in Channelrhodopsin-1. *Journal of the American Chemical Society*, 138(14), pp.4757–4762.
- Schneider, F., 2014. Design and electrophysiological characterization of rhodopsin-based optogenetic tools. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Schneider, F., Gradmann, D. & Hegemann, P., 2013. Ion Selectivity and Competition in Channelrhodopsins. *Biophysical Journal*, 105(1), pp.91–100.
- Schneider, F., Grimm, C. & Hegemann, P., 2015. Biophysics of Channelrhodopsin. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), pp.167–186.
- Schneider, M., Marison, I.W. & von Stockar, U., 1996. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46(3), pp.161–185.
- Schobert, B. *et al.*, 2002. Crystallographic Structure of the K intermediate of Bacteriorhodopsin: Conservation of Free Energy after Photoisomerization of the Retinal. *Journal of Molecular Biology*, 321(4), pp.715–726.
- Schobert, B. & Lanyi, J.K., 1982. Halorhodopsin Is a Light-driven Chloride Pump. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), pp.10306–10313.
- Scholz, F. *et al.*, 2012. Tuning the Primary Reaction of Channelrhodopsin-2 by Imidazole, pH, and Site-Specific Mutations. *Biophysical Journal*, 102(11), pp.2649–2657.
- Schultz, K.C. *et al.*, 2006. A Genetically Encoded Infrared Probe. *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), pp.13984–13985.
- Schwarz, F. *et al.*, 2010. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nature Chemical Biology*, 6(4), pp.264–266.
- Sehna, D. *et al.*, 2013. MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *Journal of Cheminformatics*, 5(39).
- Sengupta, A. *et al.*, 2016. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Molecular Medicine*, 8(11), pp.1248–1264.
- Shafer, A.M. *et al.*, 2004. Site-Specific Insertion of Spin-Labeled L-Amino Acids in *Xenopus* Oocytes. *Biochemistry*, 43(26), pp.8470–8482.

- Shaner, N.C. *et al.*, 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), pp.1567–1572.
- Shen, B. *et al.*, 2011. Genetically Encoding Unnatural Amino Acids in Neural Stem Cells and Optically Reporting Voltage-Sensitive Domain Changes in Differentiated Neurons. *STEM CELLS*, 29(8), pp.1231–1240.
- Shevchenko, V. *et al.*, 2017. Inward H⁺ pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach. *Science Advances*, 3(9), p.e1603187.
- Shimono, K. *et al.*, 1997. Functional expression of *pharaonis* phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 420(1), pp.54–56.
- Shu, X. *et al.*, 2006. Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits. *Biochemistry*, 45(32), pp.9639–9647.
- Shull, G.E., 1990. cDNA Cloning of the β -Subunit of the Rat Gastric H,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), pp.12123–12126.
- Sievers, F. *et al.*, 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539), pp.1–6.
- Silverman, L.N. *et al.*, 2007. Vibrational Stark Effect Probes for Nucleic Acids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(40), pp.11611–11613.
- Sineshchekov, O.A. *et al.*, 2012. Enhancement of the Long-Wavelength Sensitivity of Optogenetic Microbial Rhodopsins by 3,4-Dehydroretinal. *Biochemistry*, 51(22), pp.4499–4506.
- Sineshchekov, O.A. *et al.*, 2013. Intramolecular Proton Transfer in Channelrhodopsins. *Biophysical Journal*, 104(4), pp.807–817.
- Sineshchekov, O.A. *et al.*, 2016. Photochemical reaction cycle transitions during anion channelrhodopsin gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), pp.E1993–E2000.
- Sineshchekov, O.A., Jung, K.-H. & Spudich, J.L., 2002. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), pp.8689–8694.
- Skerra, A., 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, 151(1–2), pp.131–135.
- Smith, I.T. & Smith, S.L., 2014. Getting it through your thick skull. *Nature Neuroscience*, 17(8), pp.1018–1019.
- Smith, J.D. *et al.*, 1960. The Nucleic Acid of Polyoma Virus. *Virology*, 12, pp.185–196.

- Smith, S.O. *et al.*, 1984. Determination of retinal Schiff base configuration in bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(7), pp.2055–2059.
- Smith, S.O. *et al.*, 1987. Vibrational Analysis of the 13-*cis*-Retinal Chromophore in Dark-Adapted Bacteriorhodopsin. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(4), pp.804–819.
- Smith, S.O., Lugtenburg, J. & Mathies, R.A., 1985. Determination of Retinal Chromophore Structure in Bacteriorhodopsin with Resonance Raman spectroscopy. *The Journal of Membrane Biology*, 85(2), pp.95–109.
- Snellenburg, J.J. *et al.*, 2012. Glotaran: A Java-Based Graphical User Interface for the R Package TIMP. *Journal of Statistical Software*, 49(3), pp.1–22.
- Sneskov, K. *et al.*, 2013. Computational screening of one- and two-photon spectrally tuned channelrhodopsin mutants. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, pp.7567–7576.
- Sonar, S. *et al.*, 1995. Site-Directed Isotope Labeling and FT-IR Spectroscopy: The Tyr 185/Pro 186 Peptide Bond of Bacteriorhodopsin Is Perturbed during the Primary Photoreaction. *Journal of the American Chemical Society*, 117(9), pp.11614–11615.
- Sonar, S. *et al.*, 1994. Site-directed isotope labelling and FTIR spectroscopy of bacteriorhodopsin. *Nature Structural Biology*, 1(8), pp.512–517.
- Song, L., El-Sayed, M.A. & Lanyi, J.K., 1993. Protein Catalysis of the Retinal Subpicosecond Photoisomerization in the Primary Process of Bacteriorhodopsin Photosynthesis. *Science*, 261(5123), pp.891–894.
- Song, S.-H. *et al.*, 2006. Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 85(1), pp.1–16.
- Sprenger, W.W. *et al.*, 1993. The Eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* Is Negatively Phototactic, with a Wavelength Dependence That Fits the Absorption-Spectrum of the Photoactive Yellow Protein. *Journal of Bacteriology*, 175(10), pp.3096–3104.
- Spudich, J.L., 2006. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends in Microbiology*, 14(11), pp.480–487.
- Spudich, J.L., Sineshchekov, O.A. & Govorunova, E.G., 2014. Mechanism divergence in microbial rhodopsins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5), pp.546–552.
- Starace, D.M. & Knox, B.E., 1998. Cloning and expression of a *Xenopus* Short Wavelength Cone Pigment. *Experimental Eye Research*, 67(2), pp.209–220.
- Steentoft, C. *et al.*, 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal*, 32(10), pp.1478–1488.
- Stehfest, K. *et al.*, 2010. The Branched Photocycle of the Slow-Cycling Channelrhodopsin-2

- Mutant C128T. *Journal of Molecular Biology*, 398(5), pp.690–702.
- Stehfest, K. & Hegemann, P., 2010. Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *ChemPhysChem*, 11(6), pp.1120–1126.
- Stensitzki, T. *et al.*, 2016. Femtosecond infrared spectroscopy of channelrhodopsin-1 chromophore isomerization. *Structural Dynamics*, 3(043208).
- Stensitzki, T. *et al.*, 2015. The primary photoreaction of channelrhodopsin-1: wavelength dependent photoreactions induced by ground-state heterogeneity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(41).
- Stierl, M. *et al.*, 2011. Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase, bPAC, of the Soil Bacterium *Beggiatoa*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), pp.1181–1188.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), pp.113–130.
- Sudo, Y. *et al.*, 2013. A Blue-shifted Light-driven Proton Pump for Neural Silencing. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), pp.20624–20632.
- Sudo, Y. *et al.*, 2011. Spectral Tuning in Sensory Rhodopsin I from *Salinibacter ruber*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), pp.11328–11336.
- Sugiyama, Y. *et al.*, 2009. Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8, pp.328–336.
- Suydam, I.T. & Boxer, S.G., 2003. Vibrational Stark Effects Calibrate the Sensitivity of Vibrational Probes for Electric Fields in Proteins. *Biochemistry*, 42(41), pp.12050–12055.
- Suzuki, T. *et al.*, 2003. Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(3), pp.711–717.
- Szundi, I., Li, H., *et al.*, 2015. *Platymonas subcordiformis* Channelrhodopsin-2 Function I. THE PHOTOCHEMICAL REACTION CYCLE. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), pp.16573–16584.
- Szundi, I., Bogomolni, R. & Kliger, D.S., 2015. *Platymonas subcordiformis* Channelrhodopsin-2 (P₁ChR2) Function II. RELATIONSHIP OF THE PHOTOCHEMICAL REACTION CYCLE TO CHANNEL CURRENTS. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), pp.16585–16594.
- Szuts, E.Z. & Harosi, F.I., 1991. Solubility of Retinoids in Water. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 287(2), pp.297–304.

- Szymanski, C.M. *et al.*, 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 32(5), pp.1022–1030.
- Takemoto, M. *et al.*, 2015. Molecular Dynamics of Channelrhodopsin at the Early Stages of Channel Opening. *PLoS ONE*, 10(6), p.e0131094.
- Talukder, P. *et al.*, 2015. Cyanotryptophans as Novel Fluorescent Probes for Studying Protein Conformational Changes and DNA–Protein Interaction. *Biochemistry*, 54(51), pp.7457–7469.
- Tam, B.M. & Moritz, O.L., 2009. The Role of Rhodopsin Glycosylation in Protein Folding, Trafficking, and Light-Sensitive Retinal Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(48), pp.15145–15154.
- Tanimoto, S. *et al.*, 2013. Involvement of glutamate 97 in ion influx through photo-activated channelrhodopsin-2. *Neuroscience Research*, 75(1), pp.13–22.
- Tanrikulu, I.C. *et al.*, 2009. Discovery of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), pp.15285–15290.
- Tasaki, T. *et al.*, 2012. The N-End Rule Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 81, pp.261–289.
- Taskent-Sezgin, H. *et al.*, 2010. Azidohomoalanine: A Conformationally Sensitive IR Probe of Protein Folding, Protein Structure, and Electrostatics. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(41), pp.7473–7475.
- Tharp, J.M. *et al.*, 2014. Genetic Incorporation of Seven *ortho*-Substituted Phenylalanine Derivatives. *ACS Chemical Biology*, 9(4), pp.884–890.
- Thielges, M.C. *et al.*, 2011. Two-Dimensional IR Spectroscopy of Protein Dynamics Using Two Vibrational Labels: A Site-Specific Genetically Encoded Unnatural Amino Acid and an Active Site Ligand. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(38), pp.11294–11304.
- Tian, F. *et al.*, 2014. A general approach to site-specific antibody drug conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(5), pp.1766–1771.
- Tian, H. *et al.*, 2014. Bioorthogonal fluorescent labeling of functional G-protein-coupled receptors. *ChemBioChem*, 15(12), pp.1820–1829.
- Tian, H., Sakmar, T.P. & Huber, T., 2015. Micelle-Enhanced Bioorthogonal Labeling of Genetically Encoded Azido Groups on the Lipid-Embedded Surface of a GPCR. *ChemBioChem*, 16(9), pp.1314–1322.
- Tian, H., Sakmar, T.P. & Huber, T., 2013. Site-Specific Labeling of Genetically Encoded Azido Groups for Multicolor, Single-Molecule Fluorescence Imaging of GPCRs. In P. M. Conn, ed. *Methods in Cell Biology*. Amsterdam: Elsevier Inc., pp. 267–303.

- Tjio, J.H. & Puck, T.T., 1958. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS II. Chromosomal Constitution of Cells in Tissue Culture. *The Journal of Experimental Medicine*, 108(2), pp.259–268.
- Tomita, H. *et al.*, 2014. Restoration of the Majority of the Visual Spectrum by Using Modified *Volvox* Channelrhodopsin-1. *Molecular Therapy*, 22(8), pp.1434–1440.
- Tookmanian, E.M. *et al.*, 2015. Azidoethoxyphenylalanine as a Vibrational Reporter and Click Chemistry Partner in Proteins. *Chemistry - A European Journal*, 21(52), pp.19096–19103.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), pp.4350–4354.
- Tromberg, B.J. *et al.*, 2000. Non-Invasive *In Vivo* Characterization of Breast Tumors Using Photon Migration Spectroscopy. *Neoplasia*, 2(1–2), pp.26–40.
- Tsunoda, S.P. & Hegemann, P., 2009. Glu 87 of Channelrhodopsin-1 Causes pH-dependent Color Tuning and Fast Photocurrent Inactivation. *Photochemistry and Photobiology*, 85(2), pp.564–569.
- Tuley, A. *et al.*, 2014. The genetic incorporation of thirteen novel non-canonical amino acids. *Chem. Commun.*, 50(20), pp.2673–2675.
- Tyagi, A. *et al.*, 2008. Photodynamics of blue-light-regulated phosphodiesterase BlrP1 protein from *Klebsiella pneumoniae* and its photoreceptor BLUF domain. *Chemical Physics*, 354, pp.130–141.
- Ullrich, S., Gueta, R. & Nagel, G., 2013. Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants. *Biological Chemistry*, 394(2), pp.271–280.
- Urlinger, S. *et al.*, 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), pp.7963–7968.
- Urmann, D. *et al.*, 2017. Photochemical Properties of the Red-shifted Channelrhodopsin Chrimson. *Photochemistry and Photobiology*, 93(3), pp.782–795.
- van der Valk, J. *et al.*, 2010. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), pp.1053–1063.
- VanGordon, M.R. *et al.*, 2017. Atomistic Study of Intramolecular Interactions in the Closed-State Channelrhodopsin Chimera, C1C2. *Biophysical Journal*, 112(5), pp.943–952.
- Verhoeven, M.-K. *et al.*, 2010. The Photocycle of Channelrhodopsin-2: Ultrafast Reaction Dynamics and Subsequent Reaction Steps. *ChemPhysChem*, 11(14), pp.3113–3122.
- Vierock, J., 2009. Charakterisierung eines Kanalrhodopsins der Alge *Dunaliella salina*.

Bachelorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin.

- Vierock, J. *et al.*, 2017. Molecular determinants of proton selectivity and gating in the red-light activated channelrhodopsin Chrimson. *Scientific Reports*, 7(9928).
- Vogele, L., 2004. Anabaena Sensory Rhodopsin: A Photochromic Color Sensor at 2.0 Å. *Science*, 306(5700), pp.1390–1393.
- Volz, P. *et al.*, 2016. Light and pH-induced Changes in Structure and Accessibility of Transmembrane Helix B and Its Immediate Environment in Channelrhodopsin-2. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33), pp.17382–17393.
- Voss, S. & Skerra, A., 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Engineering Design and Selection*, 10(8), pp.975–982.
- Wacker, M. *et al.*, 2002. N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*. *Science*, 298(5599), pp.1790–1793.
- Waegele, M.M., Tucker, M.J. & Gai, F., 2009. 5-Cyanotryptophan as an infrared probe of local hydration status of proteins. *Chemical Physics Letters*, 478(4–6), pp.249–253.
- Wagner, J.R. *et al.*, 2008. Mutational Analysis of *Deinococcus radiodurans* Bacteriophytochrome Reveals Key Amino Acids Necessary for the Photochromicity and Proton Exchange Cycle of Phytochromes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), pp.12212–12226.
- Wagner, V. *et al.*, 2007. The Phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* Eyespot Fraction Includes Key Proteins of the Light Signaling Pathway. *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(2), pp.772–788.
- Wand, A. *et al.*, 2013. Shedding New Light on Retinal Protein Photochemistry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 64(1), pp.437–458.
- Wang, H. *et al.*, 2009. Molecular Determinants Differentiating Photocurrent Properties of Two Channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), pp.5685–5696.
- Wang, K. *et al.*, 2007. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nature Biotechnology*, 25(7), pp.770–777.
- Wang, L. *et al.*, 2000. A New Functional Suppressor tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Pair for the in Vivo Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 122(20), pp.5010–5011.
- Wang, W. *et al.*, 2012. Tuning the Electronic Absorption of Protein-Embedded All-*trans*-Retinal. *Science*, 338, pp.1340–1343.
- Wang, Y.-S. *et al.*, 2013. Genetic Incorporation of Twelve *meta*-Substituted Phenylalanine

- Derivatives Using a Single Pyrrolysyl-tRNA Synthetase Mutant. *ACS Chemical Biology*, 8(2), pp.405–415.
- Watanabe, H.C. *et al.*, 2012. Structural Model of Channelrhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), pp.7456–7466.
- Watanabe, H.C. *et al.*, 2013. Towards an understanding of channelrhodopsin function: Simulations lead to novel insights of the channel mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 425(10), pp.1795–1814.
- Welke, K. *et al.*, 2011. Color Tuning in Binding Pocket Models of the Chlamydomonas-Type Channelrhodopsins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(50), pp.15119–15128.
- Wietek, J. *et al.*, 2015. An improved chloride-conducting channelrhodopsin for light-induced inhibition of neuronal activity in vivo. *Scientific Reports*, 5(14807).
- Wietek, J. *et al.*, 2014. Conversion of Channelrhodopsin into a Light-Gated Chloride Channel. *Science*, 344(6182), pp.409–412.
- Wietek, J. *et al.*, 2016. Identification of a Natural Green Light Absorbing Chloride Conducting Channelrhodopsin from *Proteomonas sulcata*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), pp.4121–4127.
- Wietek, J. & Prigge, M., 2016. Enhancing Channelrhodopsins: An Overview. In A. Kianianmomeni, ed. *Optogenetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana Press, pp. 141–165.
- Wiltschko, W. & Wiltschko, R., 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 191(8), pp.675–693.
- Wolf, S., Freier, E. & Gerwert, K., 2008. How Does a Membrane Protein Achieve a Vectorial Proton Transfer Via Water Molecules? *ChemPhysChem*, 9(18), pp.2772–2778.
- Wolfshorndl, M.P. *et al.*, 2012. Covalently Bound Azido Groups Are Very Specific Water Sensors, Even in Hydrogen-Bonding Environments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(3), pp.1172–1179.
- Wong, G.G. *et al.*, 1985. Human GM-CSF: Molecular Cloning of the Complementary DNA and Purification of the Natural and Recombinant Proteins. *Science*, 228(4701), pp.810–815.
- Wood, W.B., 1966. Host Specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial Mutations affecting the Restriction and Modification of DNA. *Journal of Molecular Biology*, 16(1), pp.118–133.
- Wu, D. *et al.*, 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484(7393), pp.214–219.

- Wu, I.-L. *et al.*, 2013. Multiple Site-Selective Insertions of Noncanonical Amino Acids into Sequence-Repetitive Polypeptides. *ChemBioChem*, 14(8), pp.968–978.
- Wurm, F.M. & Hacker, D., 2011. First CHO genome. *Nature Biotechnology*, 29(8), pp.718–720.
- Xu, X. *et al.*, 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29(8), pp.735–741.
- Yanagisawa, T. *et al.*, 2008. Multistep Engineering of Pyrrolysyl-tRNA Synthetase to Genetically Encode N^F-(*o*-Azidobenzyloxycarbonyl) lysine for Site-Specific Protein Modification. *Chemistry & Biology*, 15(11), pp.1187–1197.
- Ye, S. *et al.*, 2009. FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nature Chemical Biology*, 5(6), pp.397–399.
- Ye, S. *et al.*, 2008. Site-specific Incorporation of Keto Amino Acids into Functional G Protein-coupled Receptors Using Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3), pp.1525–1533.
- Ye, S. *et al.*, 2010. Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature*, 464(7293), pp.1386–1389.
- Yee, E.F. *et al.*, 2015. Signal transduction in light–oxygen–voltage receptors lacking the adduct-forming cysteine residue. *Nature Communications*, 6(10079).
- Yeh, K.-C. *et al.*, 1997. A Cyanobacterial Phytochrome Two-Component Light Sensory System. *Science*, 277(5331), pp.1505–1508.
- Yizhar, O. *et al.*, 2011. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363), pp.171–178.
- Yoshida, K. *et al.*, 2017. A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), pp.7531–7541.
- Young, N.M. *et al.*, 2002. Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.42530–42539.
- Young, T.S. *et al.*, 2009. Expanding the Genetic Repertoire of the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 48(12), pp.2643–2653.
- Zhang, F. *et al.*, 2006. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature Methods*, 3(10), pp.785–792.
- Zhang, F. *et al.*, 2008. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carterii*. *Nature Neuroscience*, 11(6), pp.631–633.

- Zhang, F. *et al.*, 2011. The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell*, 147(7), pp.1446–1457.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L., 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research*, 32(14), p.e115.
- Zheng, Y. *et al.*, 2017. Virus-Enabled Optimization and Delivery of the Genetic Machinery for Efficient Unnatural Amino Acid Mutagenesis in Mammalian Cells and Tissues. *ACS Synthetic Biology*, 6(1), pp.13–18.
- Zhong, Q. *et al.*, 1996. Reexamining the Primary Light-Induced Events in Bacteriorhodopsin Using a Synthetic C₁₃=C₁₄-Locked Chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 118(50), pp.12828–12829.
- Zhou, P. *et al.*, 2009. Geometric characteristics of hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(1), pp.151–163.
- Zhu, S. *et al.*, 2014. Genetically encoding a light switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), pp.6081–6086.
- Ziegler, T. & Möglich, A., 2015. Photoreceptor engineering. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(30).

6. Appendix

6.1 Ergänzende Daten

6.1.1 Retinale

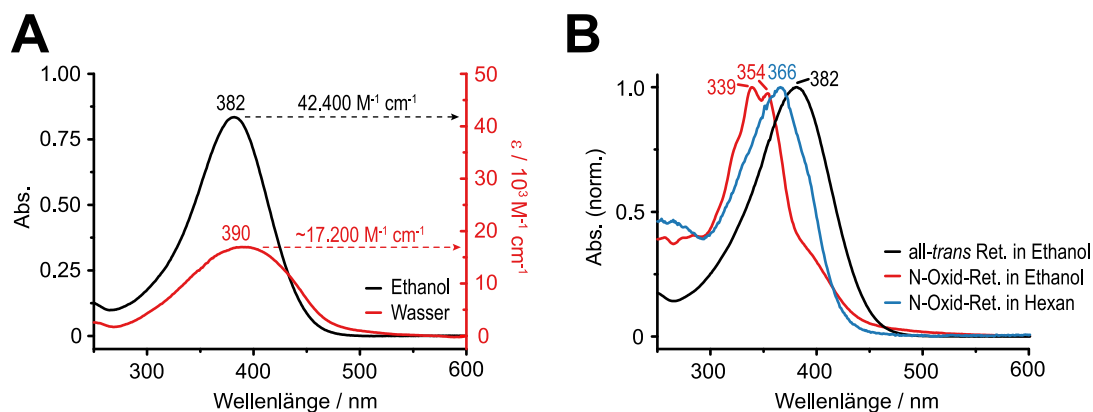


Abbildung A 1: Lösungsmittelabhängigkeit von all-*trans*- und N-Oxid-Retinal. **A)** UV-vis-Spektren von all-*trans*-Retinal ($c = 22 \mu\text{M}$) in Ethanol (*schwarz*) und Wasser (*rot*). Extinktionskoeffizient (ϵ) für all-*trans*-Retinal in Ethanol entnommen aus Szuts & Harosi (1991). Der ermittelte ϵ_{390} für Retinal in Wasser ist in guter Übereinstimmung mit einem publizierten Wert von $17.900 \pm 3.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in salinem Phosphatpuffer (1 mM Natriumphosphat pH 7.2 - 7.3, 150 mM NaCl) (Szuts & Harosi 1991). **B)** Normierte UV-vis-Spektren von N-Oxid-Retinal in Ethanol (*rot*) und Hexan (*blau*) im Vergleich zu all-*trans*-Retinal in Ethanol (*schwarz*).

6.1.2 Aromatische Aminosäuren und Cystin

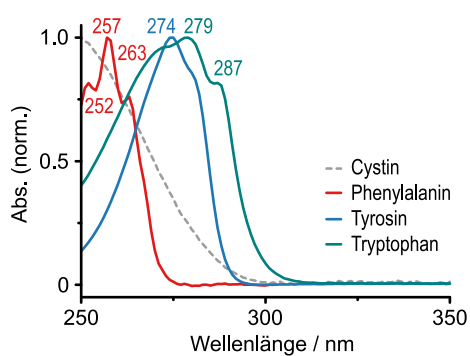


Abbildung A 2: UV-vis-Spektren der aromatischen Aminosäuren und dem Dipeptid Cystin. Normierte Spektren der Substanzen in wässriger Lösung.

6.1.3 UV-vis-Spektroskopie von C1V1-25A

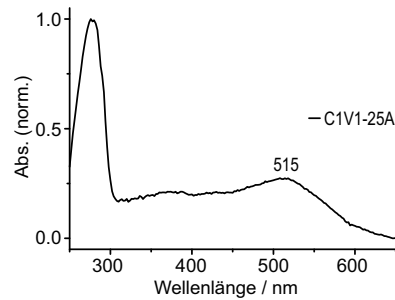


Abbildung A 3: UV-vis-Spektrum von C1V1-25A. Protein wurde in HEK293T (Transfektion mit Lipofectamine & PLUS) exprimiert und anschließend mittels 1D4-Immunoaffinitätschromatographie (DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM) aufgereinigt. Ausbeute (2.66 μg / 55 cm^2 Kulturschale) wurde auf Basis der Chromophorabsorption und einem Extinktionskoeffizienten von 50.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ berechnet.

6.1.4 Salzabhängigkeit von C1C2-E129A

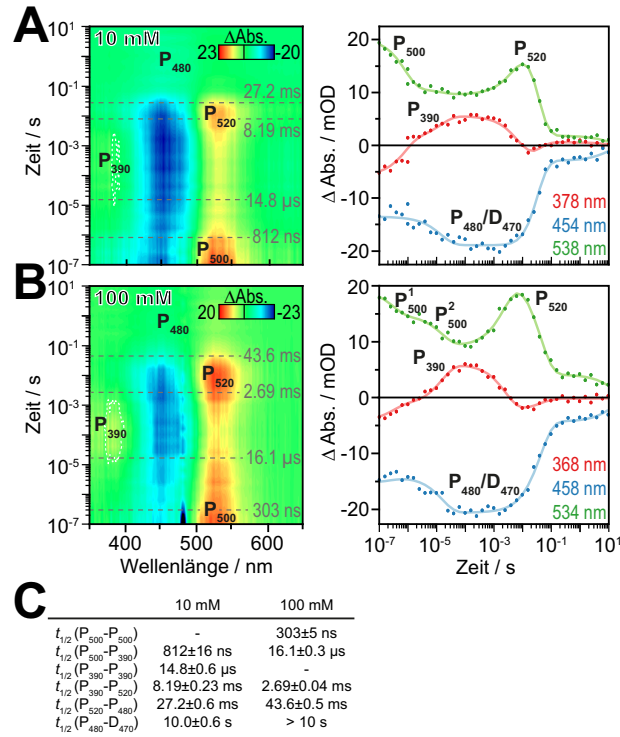


Abbildung A 4: Transiente UV-vis-Spektroskopie von C1C2-E129A in Abhängigkeit der Salzkonzentration. Rekombinantes C1C2-E129A (E90A in C₇ChR2) einer optischen Dichte von $A_{\text{Chrom}} = 0.45 - 0.50$ in 20 mM HEPES pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM mit 10 mM (A) oder 100 mM NaCl (B) wurde mit kurzen Laserpulsen (480 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 4.08 MHz) angeregt und die induzierten Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) zwischen 100 ns und 10 s (8 Zyklen) aufgezeichnet. Bei A wurde das Messlicht in Zeitbereichen $\leq 1 \mu\text{s}$ gepulst (150 V). Bei B wurde im CW-Modus ohne Pulser gemessen. Aufgrund der längeren Blendenöffnungszeit der Kamera (TTL = 160 ns) im CW-Modus ist ein Übersättigungssignal des Laserpulses bei 480 nm im Zeitbereich $< 1 \mu\text{s}$ zu beobachten. Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue gestrichelte Linien, links) wurden aus globaler Analyse mit fünf Komponenten gewonnen. Einzelne Wellenlängenspurten wurden aus A bzw. B extrahiert (rechts). SVD-rekonstruierte Daten (Punkte) und globaler Fit (Linien) sind dargestellt. C) Zusammenfassung der beobachteten spektralen Übergänge und deren Halbwertszeiten. Rekombinantes Protein wurde von Dr. Shoko Hososhima (Department of Developmental Biology and Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Life Sciences, Sendai, Japan) unter der Anleitung von Christina Schnick und Dr. Katja Stehfest (beide AG Hegemann, HU Berlin) aus *P. pastoris* aufgereinigt.

6.1.5 „Gegenionenmutanten“ von Chronos

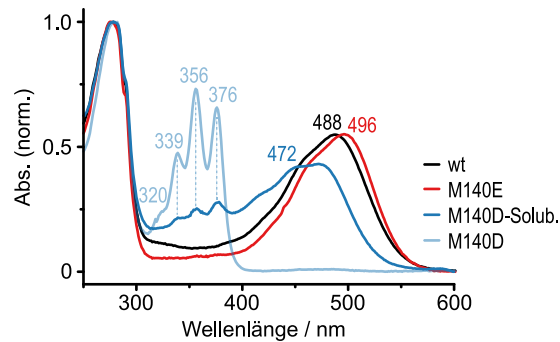


Abbildung A 5: Gegenionenmutanten von Chronos. Normierte UV-vis-Spektren von Chronos (*schwarz*), M140E (E123 in *CrChR2*, *rot*) und M140D rekonstituiert während der Solubilisierung (*dunkelblau*) bzw. Retinal-Zugabe zum Zeitpunkt der Transfektion (*hellblau*). Spektren in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM.

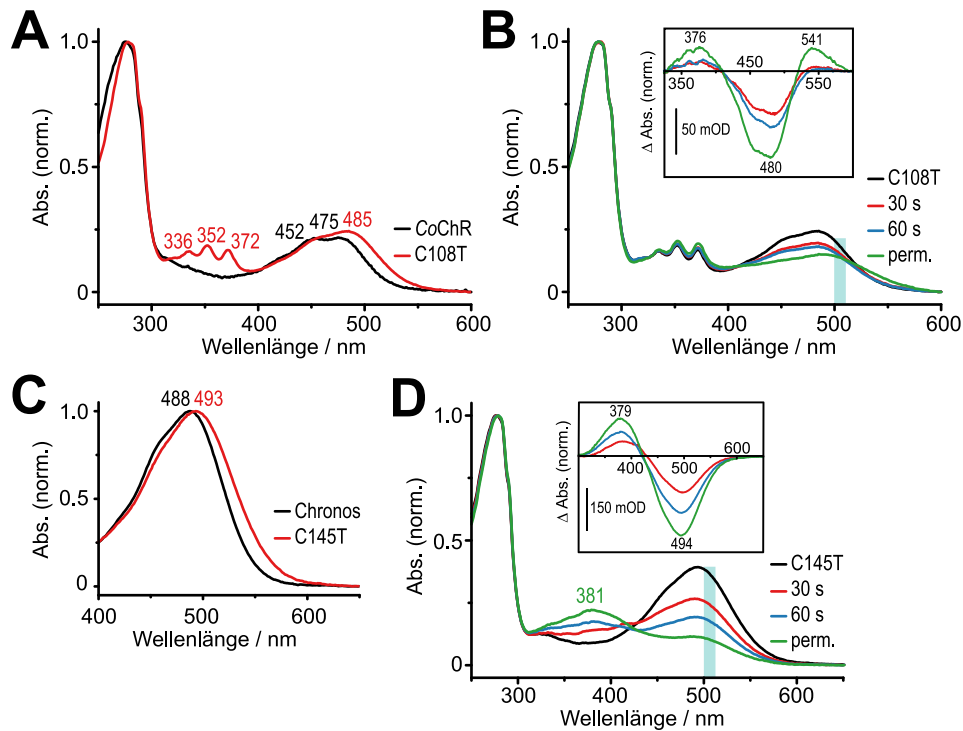
6.1.6 DC-Paar-Mutanten von *CoChR* und Chronos

Abbildung A 6: DC-Paar-Mutanten von *CoChR* und Chronos. Die *CrChR2*-C128T-analoge Mutation wurde auf *CoChR* (**A**, **B**) und Chronos (**C**, **D**) transferiert. Absorptionsänderungen nach Belichtung (30 s, 60 s oder permanent, 505 nm, LED) von *CoChR*-C108T (**B**) und Chronos-C145T (**D**). Differenzspektren (Licht minus Dunkel) wurden berechnet (Einschub). Spektren in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM.

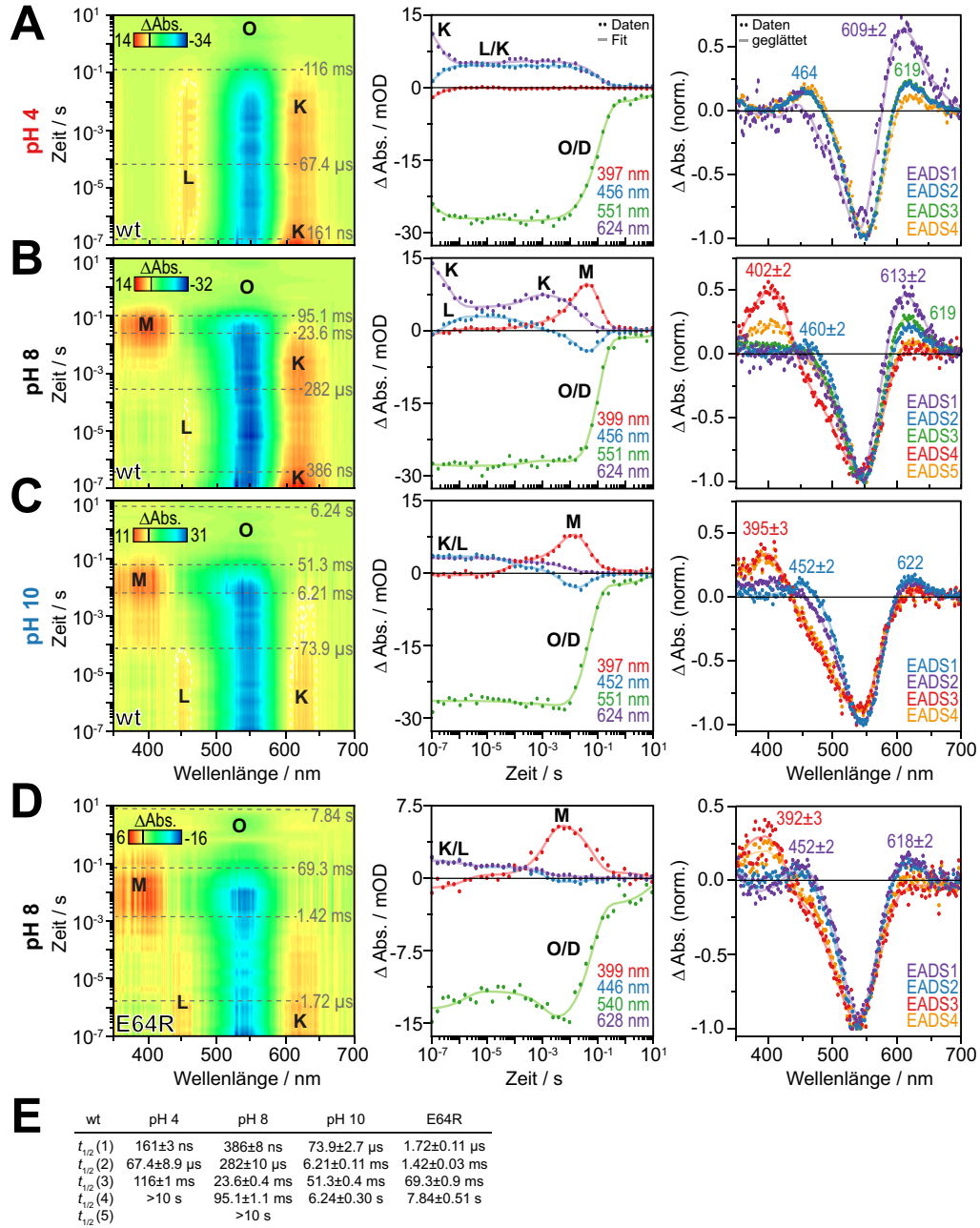
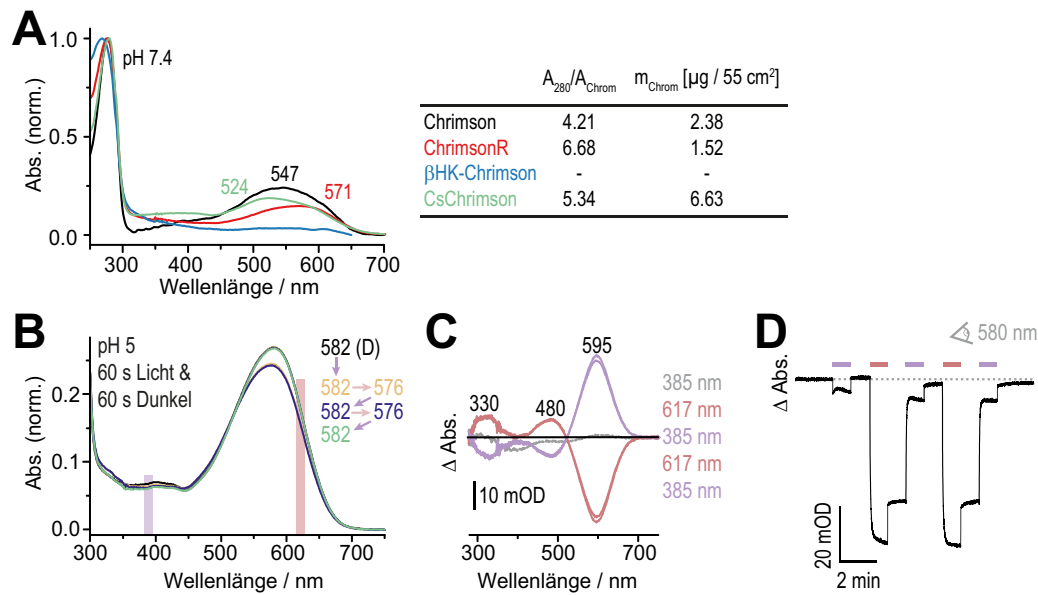
6.1.7 Transiente UV-vis-Spektroskopie von *Ps*ACR1

Abbildung A 7: Transiente UV-vis-Spektroskopie des anionenleitenden *Ps*ACR1 und E64R. UV-vis-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, in mOD) von rekombinantem *Ps*ACR1 ($\text{OD}_{\text{Chrom}} = 0.7 - 1.0$) nach Laseranregung (535 nm, 10 ns, 5 mJ, Belichtungsfrequenz: 15.38 mHz). Absorptionsänderungen bei pH 4 (**A**, $\lambda_{\text{max}} = 534$ nm, 20 mM Citrat, 15 Zyklen), pH 8 (**B**, $\lambda_{\text{max}} = 534$ nm, 20 mM TRIS, 15 Zyklen) und pH 10 (**C**, $\lambda_{\text{max}} = 524$ nm, 20 mM CAPS, 8 Zyklen) wurden gemessen (CW, ohne Messlichtverstärkung im frühen Zeitbereich durch den Pulser). Gezeigt ist jeweils der Konturplot mit Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue Striche) der spektralen Komponenten (links), Einzelwellenlängenkinetiken (Mitte) und normierte EADS mitsamt Absorptionsmaxima (rechts). Blitzlicht-Photolyse von *Ps*ACR1-E64R bei pH 8 (**D**, $\lambda_{\text{max}} = 528$ nm, $\text{OD}_{\text{Chrom}} = 0.7$, 20 mM TRIS, 11 Zyklen, $\lambda_{\text{Exz}} = 530$ nm). EADS und deren $t_{1/2}$ resultieren aus globaler Analyse (Glotaran) mit 4 - 5 Komponenten. Alle verwendeten Puffer mit 150 mM NaCl und 0.02 % (w/v) DDM. **E**) Zusammenfassung aller Halbwertszeiten. Proteinpräparation erfolgte in *P. pastoris* von Melanie Meiworm unter der Anleitung von Dr. Matthias Broser (beide AG Hegemann, HU Berlin). Transiente UV-vis-Messungen inkl. Datenauswertung wurde von Benjamin Krause absolviert.

6.1.8 Expression und UV-vis-Spektroskopie von (Cs)Chrimson

**Abbildung A 8: Expression von Chrimson-Varianten und Doppelbelichtungsexperimente an CsChrimson.**

A) Normierte UV-vis-Spektren und deren Absorptionsmaxima von aufgereinigtem Chrimson (1 - 350 AS), ChrimsonR (Chrimson mit K176R), $\beta\text{-HK-Chrimson}$ (Chrimson (1 - 350 AS) mit N-terminaler $\beta\text{-HK}$ und TEV-Proteaseschnittstelle) und CsChrimson (Chimäre aus *Chloromonas subdivisa* (1 - 79 AS, Protein-ID: AHH02144) und Chrimson (85 - 350 AS)) nach 1D4-Immunoaffinitätschromatographie (DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM) aus HEK293T. Protein-zu-Chromophor-Verhältnis (A_{280}/A_{Chrom}) und Ausbeute pro Kulturschale (55 cm² Wachstumsfläche) sind zusammengefasst. Ausbeute wurde über Chromophorabsorption ($\epsilon_{\text{Chrom}} = 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet. Man beachte die unterschiedlich großen Extinktionswerte der Proteinabsorption bei 280 nm nach Austausch des N-Terminus ($\epsilon_{280}(\text{Chrimson}) = 102.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ vs. $\epsilon_{280}(\text{CsChrimson}) = 86.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). **B)** UV-vis Spektren nach sequentieller Belichtung von CsChrimson bei pH 5 (20 mM Citrat, 100 mM NaCl & 0.03 % (w/v) DDM) mit Lichtpulsen von 385 nm (BioLED, Mightex Systems, 60 s, $2.57 \times 10^{16} \text{ Photonen mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bzw. 617 nm (BioLED, 60 s, $2.48 \times 10^{16} \text{ Photonen mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und anschließender Dunkelphase (60 s). Absorptionsmaxima (in nm) sind skizziert. **C)** Berechnete Differenzspektren (Daten aus B) und deren Absorptionsmaxima. **D)** Einzelwellenlängenkinetik bei 580 nm während Doppelbelichtungsprotokoll (wie in B). Messungen aus B - D wurden zusammen mit Johannes Vierock (AG Hegemann, HU Berlin) absolviert. Protein wurde zuvor von Thi Bich Thao Nguyen (AG Hegemann, HU Berlin) unter der Anleitung von Johannes Vierock aus *P. pastoris* exprimiert.

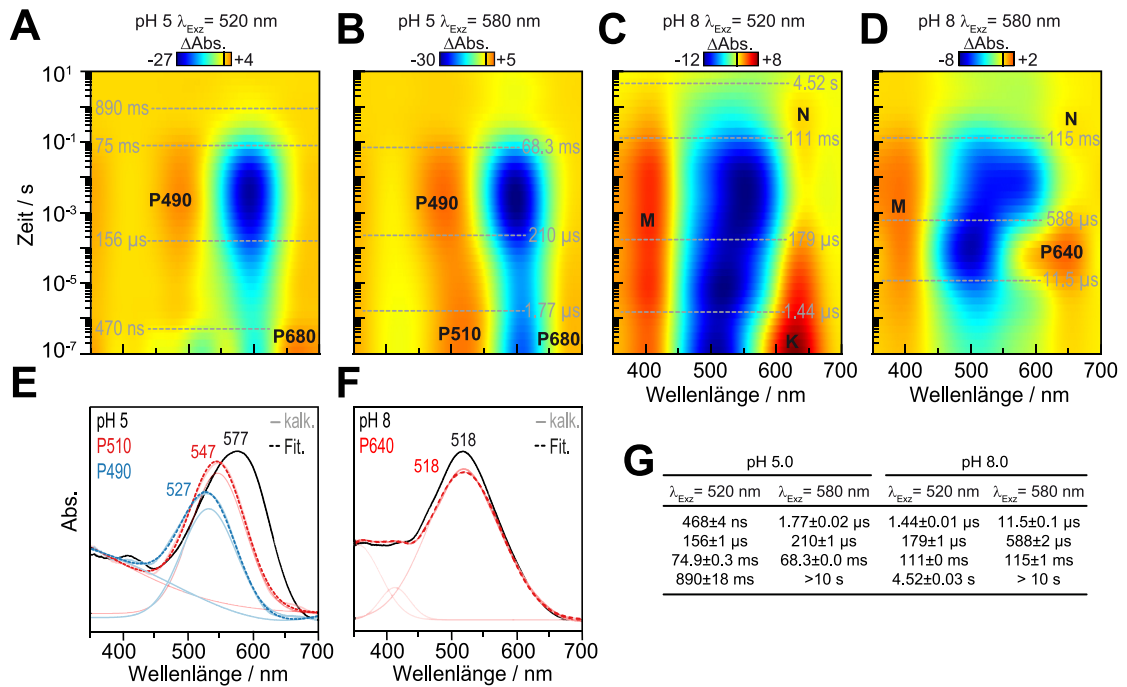


Abbildung A 9: Transiente UV-vis-Spektroskopie von CsChrimson. Absorptionsänderungen (Licht minus Dunkel, in mOD) von rekombinantem CsChrimson ($\text{OD}_{\text{Chrom}} = 0.40 - 0.46$, 12 - 22 Zyklen) bei pH 5 (**A & B**, 20 mM Citrat) bzw. pH 8 (**C & D**, 20 mM TRIS) nach Laseranregung (3 - 4 mJ, Belichtungsfrequenz: 15.38 mHz) mit 520 nm (**A & C**) bzw. 580 nm (**B & D**). Alle verwendeten Puffer mit 100 mM NaCl und 0.03 % (w/v) DDM. Die einzelnen Datensätze wurden aus den am meisten signifikanten Komponenten der SVD-Analyse rekonstruiert. Es folgte eine Reduktion des Rauschens mittels doppelter Fourier-Transformation (MATLAB R2013b, Routine: „MyFFT“, programmiert von Dr. Rolf Micha Hagedorn (AG Hegemann, HU Berlin), basiert auf fft2 & ifft2, Parameter: 10 Wellenlängen- & 10 Zeitdatenpunkte). Halbwertszeiten ($t_{1/2}$, graue Striche) wurden durch eine globale Analyse (Glutaran, vier Komponenten) der rekonstruierten Daten ermittelt. Benennung der Intermediate in Analogie zu BR bzw. nach deren Absorptionsmaxima im Differenzspektrum (in nm). Berechnung von Absolutspektren der neu identifizierten Intermediate bei pH 5 (**E**) bzw. pH 8 (**F**). Es wurde eine Photoaktivierung von 10.5 % des eingesetzten Proteins zugrunde gelegt (Dunkelspektrum, schwarz) und mit dem Differenzspektrum bei maximaler Akkumulation während des Photozyklus ($t_{\text{max}}(\text{P510}) = 1 \mu\text{s}$; $t_{\text{max}}(\text{P480}) = 1.58 \text{ ms}$ & $t_{\text{max}}(\text{P640}) = 63.1 \mu\text{s}$) addiert. Berechnete Spektren („kalk.“) wurden mittels Gauß-Glockenkurven (Einzelkomponenten: dünne Linien; Summe: gestrichelt, „Fit“) angefitet. **G**) Zusammenfassung der Halbwertszeiten aus A - D. Protein wurde von Thi Bich Thao Nguyen unter der Anleitung von Johannes Vierock (beide AG Hegemann, HU Berlin) aus *P. pastoris* exprimiert. Transiente UV-vis-Messungen inkl. Datenauswertung wurde von Benjamin Krause durchgeführt.

6.1.9 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Mutanten

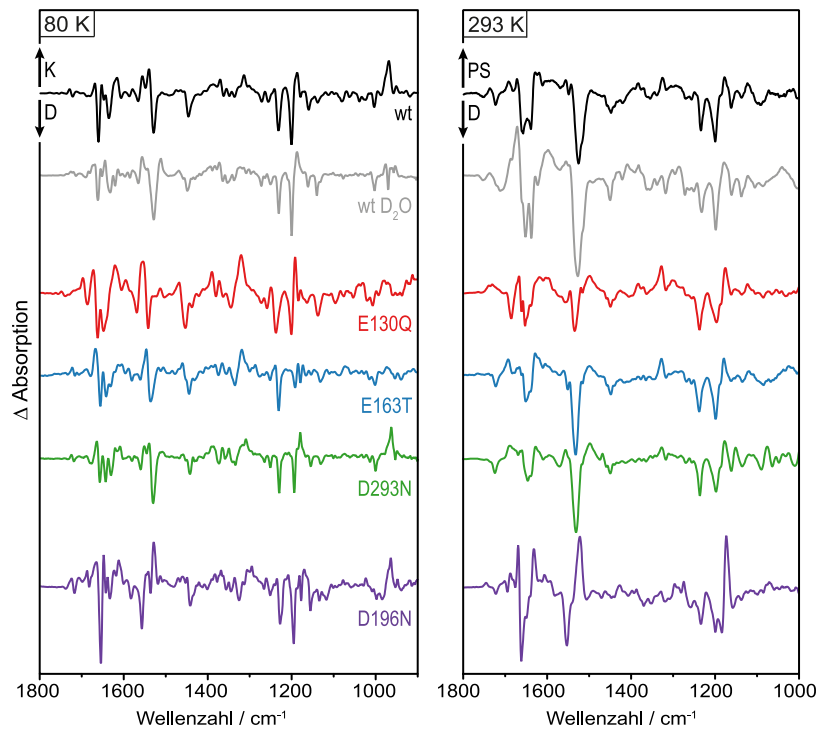


Abbildung A 10: Photostationäre FTIR-Differenzspektren von ReaChR und Mutanten. Differenzspektren (Licht minus Dunkel) der photostationären Zustände (~ 530 nm LED) bei 80 K (*links*) und 293 K (*rechts*) sind normiert auf Retinal-Fingerprinthe des WT bei 1234(-) cm^{-1} . Spektren in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM. Proteinaufreinigung wurde von Benjamin Krause und Messungen sowie Datenprozessierung von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt.

6.1.10 Western Blots von Azidomutanten von C1C2

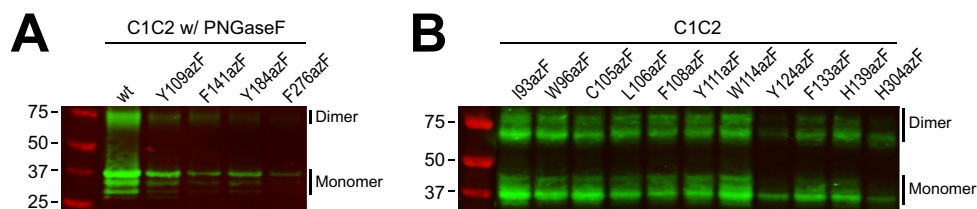


Abbildung A 11: Western-Blots von Azidomutanten von C1C2. **A)** Western Blot (Antikörper: 1) Hybridoma 1D4, 2) *anti*-Maus IRDye 800CW) von 30 μg deglycosyliertem (PNGaseF-Behandlung) Gesamtprotein aus Zelllysate nach elektrophoretischer Trennung mittels semi-denaturierender SDS-PAGE. Molekularmarker in kDa, $M_w(\text{C1C2}) = 40.8$ kDa. **B)** Western Blot (wie A) von 30 μg Gesamtprotein aus Zelllysate nach elektrophoretischer Trennung mittels semi-denaturierender SDS-PAGE. In beiden Blots ist eine sukzessive Abnahme des Expressionsgrads bei Aminosäuresubstitution näher zum C-Terminus zu verzeichnen.

6.1.11 FTIR-Dunkelspektren von ReaChR und Azidomutanten.

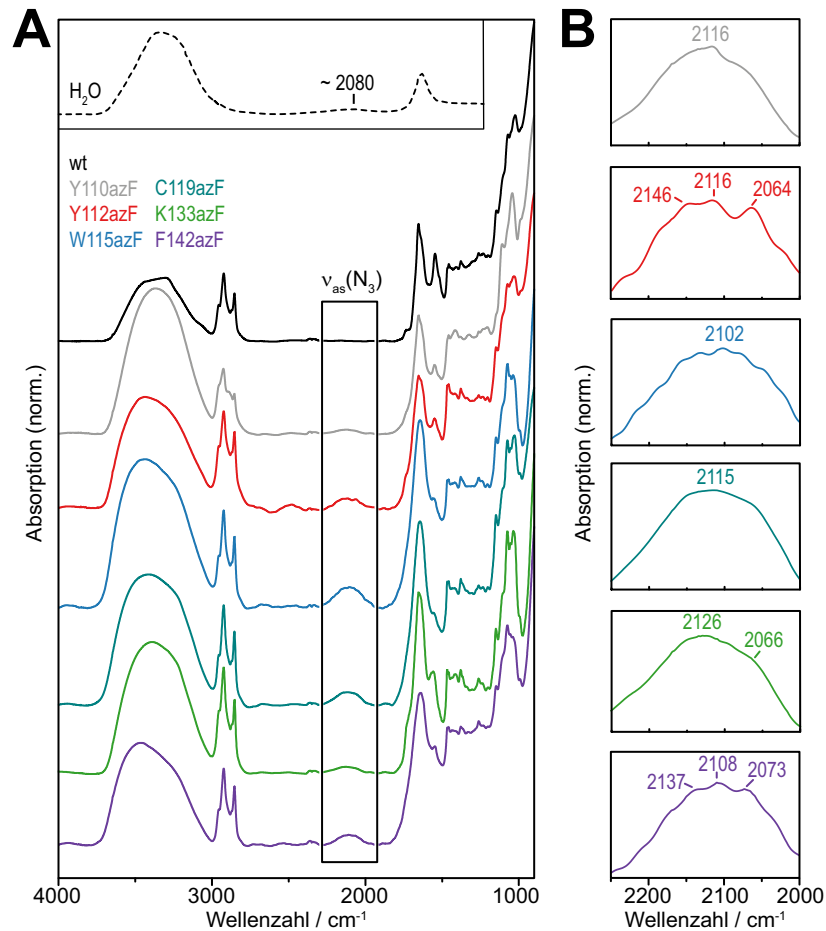


Abbildung A 12: FTIR-Dunkelspektren von ReaChR und Azidomutanten. **A)** Einzelkanalspektren in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM sind normiert auf Banden bei 900 cm⁻¹ und spektraler Bereich der asymmetrischen Streckschwingung der Azidogruppe ($\nu_{as}(N_3)$) ist indiziert (*Rahmen*). Wasserspektrum (Einschub) entnommen aus Bertie *et al.* (1989). **B)** Vergrößerter und normierter Spektralbereich der $\nu_{as}(N_3)$. Messungen wurden von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) durchgeführt. Basislinien-Korrektur wurde von Benjamin Krause mit Origin Pro 8G durchgeführt.

6.1.12 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Azidomutanten

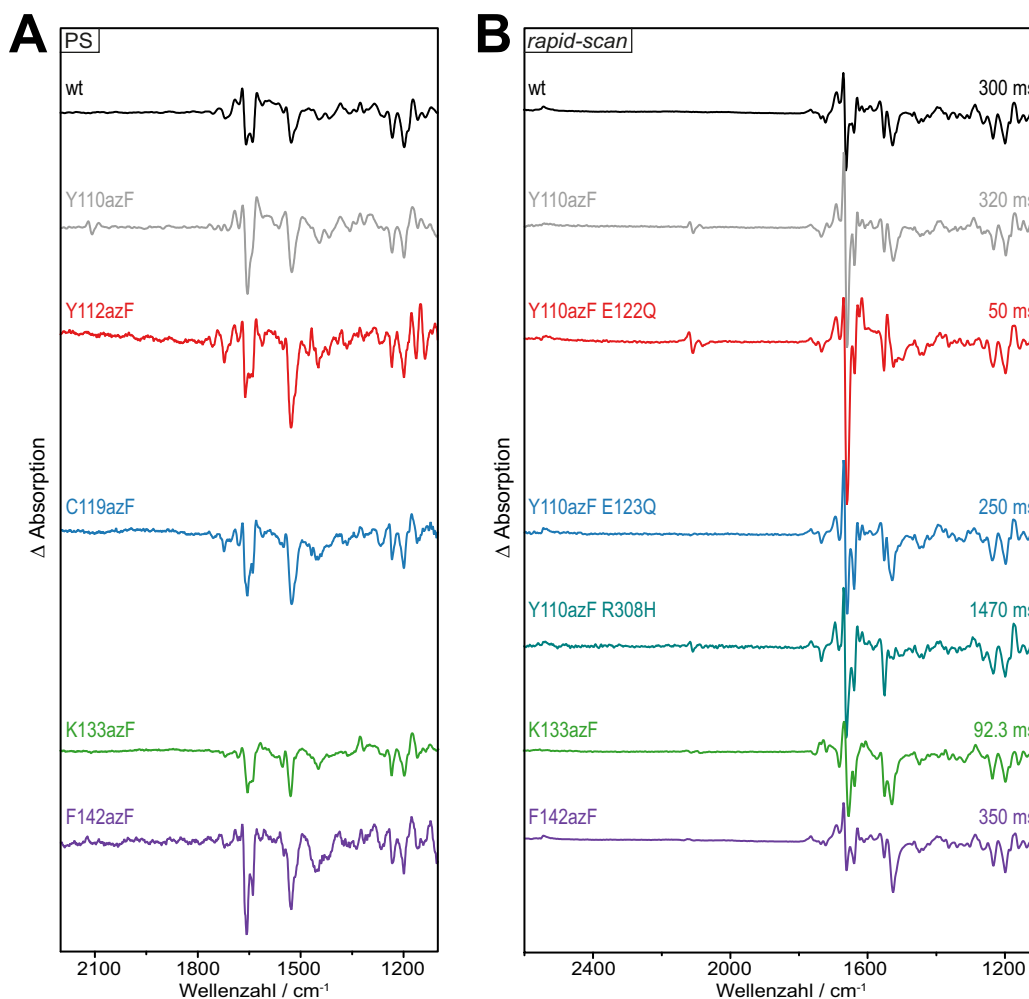


Abbildung A 13: Vergleich von photostationären und *rapid-scan*-FTIR-Differenzspektren der Azidomutanten. Photostationäre Differenzspektren (Licht minus Dunkel, **A**) und *rapid-scan*-Amplitudenspektren (**B**) normiert auf Retinal-Bande bei 1200(-) cm⁻¹. Anregung erfolgte mit einer LED (~530 nm, A) oder mit einem Laser (532 nm, 3 - 5 ns, 20 mJ, Belichtungsfrequenz: 0.4 Hz, B). Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) des Zerfalls der Amplitudenspektren sind gezeigt (in B). Proben wurden equilibriert in DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM (A) oder Niedrigsalz-PBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM (B). Messung erfolgte bei 20 °C (A) oder 15 °C (B). Probenaufreinigung durchgeführt von Benjamin Krause. Photostationäre Messungen inkl. Datenprozessierung wurden von Joel Kaufmann (AG Bartl, Charité Berlin) und *rapid-scan*-Messungen mitsamt Auswertung von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr Universität Bochum) ausgeführt.

6.1.13 FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR-Y110azF-N305H

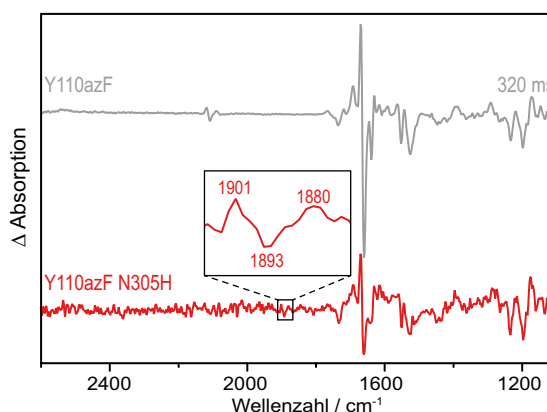


Abbildung A 14: FTIR-Amplitudenspektrum von ReaChR-Y110azF-N305H. FTIR-Amplitudenspektren (normiert auf Retinal-Bande bei 1200(-) cm^{-1}) von Y110azF (*grau*) und Y110azF-N305H (*rot*) in Niedrigsalz-PBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM bei 15 °C nach Laseranregung (532 nm, 3 - 5 ns, 20 mJ, Belichtungsfrequenz: 0.4 Hz). Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Zerfalls des Amplitudenspektrums von Y110azF ist aufgeführt. Aufgrund von geringer Probenmenge war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Doppelmutante im spektralen Bereich $> 1800 \text{ cm}^{-1}$ mangelhaft und die Bestimmung einer Zerfallskonstante nicht möglich. Ein Y110azF-analoges Bandenmuster wurde dennoch zwischen 1910 und 1850 cm^{-1} ausgemacht (Einschub), allerdings ca. 200 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Ein Grund könnte eine direkte Wechselwirkung der Azidogruppe mit dem eingebrachten Histidin sein, welches sich auf Basis eines Strukturmodells zumindest in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden würde. Probenpräparation wurde von Benjamin Krause und Infrarot-Messungen sowie Datenprozessierung von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr Universität) durchgeführt.

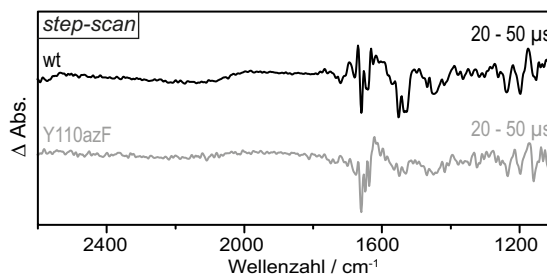
6.1.14 *Step-scan*-FTIR-Differenzspektroskopie von ReaChR und Y110azF

Abbildung A 15: *Step-scan*-FTIR-Spektren von ReaChR und Y110azF. FTIR-Differenzspektren (Licht minus Dunkel, normiert auf Retinal-Bande bei 1200(-) cm^{-1}) gemittelt im Zeitbereich zwischen 20 und 50 μs nach Laseranregung (532 nm, 3 - 5 ns, 20 mJ) bei 15 °C. Aufgrund des hohen Salzgehalts in den Proben (DPBS pH 7.4 incl. 0.03 % (w/v) DDM) führten Hitzeartefakte zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und einer Grundlinienschwankung. Probenpräparation wurde von Benjamin Krause und Infrarot-Messungen sowie Datenprozessierung von Dr. Jens Kuhne (AG Gerwert, Ruhr Universität) durchgeführt.

6.2 Verwendete Geräte und deren Hersteller

Tabelle A 1: Auflistung von Herstellern.

Firma	Firmensitz
Acros Organics	jetzt: Thermo Fisher Scientific
Addgene	Cambridge, MA, USA
Adobe Systems	San José, CA, USA
Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Andor Technology Ltd	Belfast, Irland
Applied Photophysics Ltd	Leatherhead, Großbritannien
Bachem Holding	Bubendorf, Schweiz
BANDELIN electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Bemis Company Inc.	Neeenah, WI, USA
Biochrom GmbH (jetzt: Merck KGaA)	Berlin, Deutschland
BioCision	San Rafael, CA, USA
Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, CA, USA
Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Branson	Danbury, CT, USA
Bruker	Billerica, MA, USA
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Clontech Laboratories (jetzt: Takahara Holdings Inc.)	Mountain View, CA, USA
Coherent Inc.	Santa Clara, CA, USA
Continuum	San Jose, CA, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
Fluka (jetzt: Merck KGaA)	Buchs St. Gallen, Schweiz
GATC Biotech AG	Konstanz, Deutschland
GE Healthcare	Chalfont St Giles, Großbritannien
GenScript	Piscataway, NJ, USA
Glycon Biochemicals GmbH	Luckenwalde, Deutschland
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich

H + P Labortechnik GmbH	München, Deutschland
Highland Technologies	San Francisco, CA, USA
HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim, Deutschland
IBA Lifesciences	Göttingen, Deutschland
IDT Integrated DNA Technologies	Coralville, IA, USA
IKA Werke GmbH & Co. KG	Staufen i. Brsg., Deutschland
Invitrogen (jetzt: Thermo Fisher Scientific)	Carlsbad, CA, USA
Julabo GmbH	Seelbach (Schutter), Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Kojair	Vilppula, Finnland
Kolmar Technologies	Newburyport, MA, USA
Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
LGC Genomics GmbH	Berlin, Deutschland
LI-COR Biosciences	Lincoln, NE, USA
Logos Biosystems	Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi, Südkorea
LOT-QuantumDesign GmbH	Darmstadt, Deutschland
Macherey-Nagel	Dürren, Deutschland
MatTek Corporation	Ashland, MA, USA
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Metrohm AG	Herisau, Schweiz
Mightex Systems	Toronto, ON, Kanada
Molecular Devices LLC	Sunnyvale, CA, USA
New Brunswick Scientific (jetzt: Eppendorf AG)	Edison, NJ
Nexcelom Bioscience LLC	Lawrence, MA, USA
Novagen (jetzt: Merck KGaA)	Madison, WI, USA
Olympus	Tokio, Japan
Optek Inc.	Carlsbad, CA, USA
OSRAM Licht AG	München, Deutschland
OriginLab Corporation	Northampton, MA, USA
Oxford Instruments	Abingdon, Großbritannien
Peqlab Biotechnologie GmbH (jetzt: VWR International LLC.)	Erlangen, Deutschland
PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Philips	Amsterdam, Niederlande
Polysciences Inc.	Warrington, PA, USA
Promega	Fitchburg, WI, USA
Quantel	Les Ulis, Frankreich
Quantum Composers Inc.	Bozeman, MT, USA
Quiagen	Hilden, Deutschland

R Foundation for Statistical Computing	Wien, Österreich
Reanal	Budapest, Ungarn
SAFC Bioscience (jetzt: Merck KGaA)	Lenexa, KS, USA
Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Schott AG	Mainz, Deutschland
Schrödinger LLC	New York, NY, USA
Scientific Industries Inc.	Bohemia, NY, USA
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich (jetzt: Merck KGaA)	St. Louis, MO, USA
Simport Scientific	Saint-Mathieu-de-Beloeil, QC, Kanada
SMB Services in Molecular Biology GmbH	Rüdersdorf, Berlin
Starna	Pfungstadt, Deutschland
Stratagene California (jetzt: Agilent Technologies)	La Jolla, CA, USA
Systec GmbH	Linden, Deutschland
Takahara Holdings Inc.	Shimogyō-ku, Kyoto, Japan
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
The Baker Company	Sanford, ME, USA
The MathWorks Inc.	Natick, MA, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thorlabs	Newton, NJ, USA
TPP Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz
Tuttnauer Europe B.V.	Breda, Niederlande
Varian Inc. (jetzt: Agilent Technologies)	Palo Alta, CA, USA
Vincent Associates	Rochester, NY, USA
VWR International LLC	Radnor, PA, USA
WTW / Xylem Analytics Germany GmbH & Co. KG	Weilheim, Deutschland
ZIEGRA-Eismaschinen	Isernhagen, Deutschland

Tabelle A 2: Auflistung der verwendeten Geräte. Wenn nicht explizit erwähnt, entstammen die Geräte dem Inventar der AG Hegemann.

Gerät	Spezifikation / Hersteller
Autoklaven	D65, Systec GmbH 2540EL, Systec GmbH 3870EL, Tuttnauer Europe B.V. Varioklav 75S, HP Medizintechnik GmbH
Blot-Kammern	Blue Flash M, Serva Electrophoresis GmbH Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Fisher Scientific (AG Sakmar)
Blitzlicht-Photolyse	LKS60, Applied Photophysics
Brutschrank	HERAccl 240, Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	ZBE150, ZIEGRA-Eismaschinen
Fluoreszenz-Mikroskop	FluoView FV1000, Olympus (AG Herrmann, HU Berlin)
Fluoreszenz-Scanner	Typhoon 9400, GE Healthcare (AG Sakmar)
FTIR-Spektrometer	ifs66v/s, Bruker (AG Bartl) Vertex 80v, Bruker (AG Gerwert)
Geldokumentation	ChemiDoc MP, Bio-Rad Laboratories Inc.
Inkubator	Innova 4200, New Brunswick Scientific / Eppendorf AG
Laser	Brilliant & Brilliant B, Quantel Minilite II, Continuum (AG Gerwert)
Lichtmikroskop	Telaval 31, Carl Zeiss
Magnetrührer	Variomag Electronicrührer Micro, H + P Labortechnik GmbH
Mikrotiterplattenschüttler	MTS4, IKA Werke GmbH & Co. KG
Multi-LED-Einheit	BioLED, Mightex Systems
Nutator	Enviro-Genie SI-1202, Scientific Industries Inc.
PCR-Thermostyzykler	Peqstar 96 Universal, Peqlab Biotechnologie GmbH
pH-Elektroden	SenTix 81, WTW / Xylem Analytics Germany GmbH & Co. KG Z451, SI Analytics / Xylem Analytics Germany GmbH & Co. KG SE100 N, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
pH-Meter	pH-Meter 761, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG pH-Meter 765 / 766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG pH-Meter 713, Metrohm AG
Platereader	SpectraMax Microplate Reader, Molecular Devices LLC (AG Sakmar) Infinite 200, Tecan Group AG
Powermeter	Field Max II mit Power Max PM10V1 (Messkopf), Coherent Inc.
Sonifikator	Digital Sonifier, Branson
Spektrophotometer	Cary 300 Bio, Varian / Agilent Technologies LAMBDA-800, PerkinElmer (AG Sakmar)
Sterilbänke	SterilGARD 400E, The Baker Company BioWizard Silver SL-130, Kojair
Temperier- und Mischgerät	Thermomixer compact, Eppendorf AG

Thermostat	RM6, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG
Ultraschallbad	Sonorex RK 100, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.
Waage	MC1 Analytics AC120S, Sartorius AG (Feinwaage) PRJ1200-3, Kern & Sohn GmbH
Wasserbad	MB, Julabo GmbH
Zellzähler	Cellometer Vision Trio, Nexcelom Bioscience LLC Luna Automated Cell Counter, Logos Biosystems
Zentrifugen	MiniSpin Plus, Eppendorf AG (Tischzentrifuge) Centrifuge 5415R, Eppendorf AG (Tischzentrifuge) Megafuge 1.0R, Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Universalzentrifuge) Avanti J-20 XP, Beckman Coulter (Hochgeschwindigkeitszentrifuge) Optima XE-90, Beckman Coulter (Ultrazentrifuge) Beckman Coulter TLA-100 (Mini-Ultrazentrifuge)
Zentrifugen-Rotoren	JLA-8.1000, Beckman Coulter 70Ti, Beckman Coulter 70.1Ti, Beckman Coulter TLA-100.3, Beckman Coulter

Danksagung

Getreu dem Motto: „Das Beste kommt zum Schluss!“ muss ich am Ende dieser Arbeit einer Vielzahl von Menschen danken, ohne deren Hilfe und Zutun dieses Werk nicht in dieser Form zustande gekommen wäre.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Peter Hegemann** für die interessante Fragestellung und die gute Betreuung während der Doktorarbeit danken. Mit seiner enormen Expertise auf dem Gebiet der Photorezeptoren lieferte er stets gute Impulse, aber auch konstruktive Kritik, welche mir halfen mehr das große Ganze zu sehen und „*dead ends*“ weitestgehend zu vermeiden. Ich rechne ihm hoch an, dass er mir die Teilnahme an einigen nationalen und internationalen Konferenzen ermöglicht hat. Der Dialog mit externen Wissenschaftlern sowie die Verfechtung seiner experimentell erhobenen Daten hatten für ihn immer einen hohen Stellenwert. Besonders dankbar bin ich ihm für seine Unterstützung meines Auslandsaufenthalts an der Rockefeller University, welcher mich fachlich und auch persönlich enorm bereichert hat. Abschließend gebührt ihm weiterer Dank für die Begutachtung und die Bewertung meiner Dissertationsschrift.

Ich danke **Prof. Franz Bartl** für die produktive Zusammenarbeit, welche in der Veröffentlichung von mehreren gemeinsamen Publikationen mündete. Natürlich bin ich ihm ebenfalls für die Erstellung eines Gutachtens zu Dank verpflichtet. Ich möchte mich recht herzlich bei **Prof. Peter Hildebrandt** bedanken, dass er als externer Gutachter fungiert und meine Arbeit bewertet. **Prof. Andreas Herrmann** gebührt Dank für den Vorsitz meiner Promotionskommission und **Prof. Holger Dobbek** für die Teilnahme als weiteres Mitglied.

Für die gute Betreuung und die Hilfe bei der Administration während meines Auslandsaufenthalts in New York stehe ich in der Schuld von **Prof. Thomas P. Sakmar**. Die inspirierende Zeit an dem Entdeckungsort von Bakteriorhodopsin (Kühlraum AG Sakmar) und der Wirkstätte von zahlreichen Nobelpreisträgern haben wohl etwas abgefärbt. Des Weiteren möchte ich meinen Dank an **Prof. Thomas Huber** bekunden, welcher mir bei experimentellen Problemen mit gutem Rat zur Seite stand. Ich konnte von seinem großen Fachwissen und seinen innovativen Ideen immer profitieren und habe die gemeinsamen Gespräche sehr geschätzt. Weiterhin möchte ich meinen Dank an **Tian He, PhD** und **Manija Kazmin** aussprechen, welche mich in die experimentellen Grundlagen der Stopp-Codon-Suppression eingeführt haben.

Zu großem Dank bin ich meinem „*partner in crime*“ **Christiane Grimm** verpflichtet, welche meine spektroskopischen Experimente mit exzellenten elektrophysiologischen Daten komplettiert hat. Es war zwar nicht immer einfach alles unter einen Hut zu bringen, aber es ist uns dennoch geglückt. In zahlreichen Diskussionen sind wir den Rätseln von ReaChR auf die Schliche gekommen. Danke für den langen Atem und die gemeinsame produktive Zeit.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei **Joel Kaufmann** für die vortreffliche Zusammenarbeit bedanken. Nicht nur als hervorragender IR-Spektroskopiker,

sondern auch als kritischer Diskussionspartner, Lektor und kreativer Kopf hat er unser gemeinsames Wirken stets positiv beeinflusst. Zusätzlich stehe ich in der Schuld für seine konstruktiven Kommentare meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich meinen Tribut an **Dr. Rolf Micha Hagedorn** zollen, welcher mich in die zeitaufgelöste UV-vis-Spektroskopie inklusive Auswertung und Instandhaltung eingelernt hat und mir als Ansprechpartner diente. Ich möchte hier dankende Worte an **Dr. Jens Kuhne** richten. Seine qualitativ hochwertigen Infrarotmessungen an den markierten Kanalrhodopsinen haben meine Arbeit substantiell unterstützt. Einen wichtigen Beitrag zu meiner Arbeit verdanke ich **Johannes Vierock**. Neben seinen Stärken als Elektrophysiologe habe ich seine guten Einfälle und sein umfassendes Literaturwissen auch „jenseits vom Tellerrand“ sehr geschätzt. Ich bedanke mich für das produktive Zusammenwirken auf dem Chrimson-Projekt und für seine dienlichen Kritikpunkte an meiner Dissertationsschrift. Bei **Christina Schnick** und **Thi Bich Thao Nguyen** möchte ich mich für die Expression und Aufreinigung von einigen Photorezeptoren bedanken. Die generierte Quantität und Qualität des Probenmaterials ermöglichte mir die Durchführung wichtiger Experimente. Ebenfalls will ich die sympathische und fruchtbare Kollaboration mit **Dr. Matthias Broser** und **Melanie Meiworm** gebührend erwähnen. Das gute Teamwork resultierte in guter Laune und der Veröffentlichung zweier Publikationen. Großen Dank möchte ich **Angela Piater** aussprechen, welche sich mit viel Engagement um die Personalfragen aller Mitarbeiter kümmerte. Sie vermochte es vorzüglich die Projekte zu „jonglieren“ und die bestmöglichen Lösungen für uns zu finden. Außerdem war sie eine große Hilfe im Bürokratiedschungel der deutschen Hochschule. **Jonas Wietek** hatte stets gute Antworten auf technische Fragen und immer auch Lösungen parat. Ich bedanke mich für das Zusammenwirken auf dem Projekt der anionenleitenden Kanalrhodopsine und seine große Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich seine Fähigkeit als wissenschaftlicher Lektor gebührend erwähnen.

Ich möchte **Dr. Arend Vogt** für seine elektrophysiologischen Messungen und **Dr. Tilo Mathes** für die Einweisung in spektroskopische Auswertsoftware und zahlreiche Tipps für die *E. coli*-Expression danken. **Dr. Katja Stehfest** stand mir zu Beginn meiner Arbeit beratend zur Seite und beantwortete alle meine Fragen. Auch während der gesamten Doktorarbeit war sie stets ein hilfreicher Ansprechpartner und wusste wie der „Hase läuft“. Zusätzlich möchte ich mich bei **Dr. Franziska Schneider** für gewisse molekularbiologische Arbeiten und einige Tipps bedanken. Ebenfalls gebührt **Dr. Thomas Korte** für die Assistenz bei der Fluoreszenzmikroskopie und **Altina Klein** für die Einführung in das Arbeiten mit adhärierenden Säugetierzellen Dank. Außerdem bin ich **Maila Reh** für die Hilfe bei zahlreichen Reparaturen und Bestellungen sowie dem Auffinden von experimentellen Utensilien äußerst dankbar.

Roman Fudim war von Anfang an meiner Seite (des Büros). Erst als Masterstudent und nun auch seit ein paar Jahren als Doktorand. Ein guter Freund und ein echtes „Käpsele“ und das nicht nur auf dem wissenschaftlichen Sektor. Uns einte eine große Affinität zur Spektroskopie, in ihrer „einfachen Komplexität“. Ein großer Dank für viele spannende Diskussionen und innovative Impulse sowie das Korrekturlesen meiner Thesis.

Des Weiteren hat sich **Ulrike Scheib** eine Würdigung an dieser Stelle verdient. Besonders möchte ich ihr für das „Händchenhalten“ und die seelische Betreuung vor meinem ersten großen Auftritt auf internationalem Parkett danken. Auch wenn die Begebenheiten an nichts zu wünschen übrig ließen, lagen die Nerven blank und sie vermochte es mir gut zuzusprechen.

Für die super Organisation der sozialen Events wie Laborausflüge, Weihnachtsfeiern und Wandertage möchte ich meinen Dank an **Dr. Wiebke Apel** richten. Nervenkitzel beim Eisstockschießen oder Knobeln beim Pub-Quiz haben unsere Arbeitsgruppe näher zusammengebracht. Zusätzlich möchte ich **Simon Kelterborn, Dr. Meike Luck, Dr. Andre Greiner, Dr. Carlos Gasser, Heide Evers, Dr. Jennifer Mehlhorn** und der **restlichen Arbeitsgruppe** für die schöne gemeinsame Zeit und das gute Miteinander danken. Es war mir eine große Freude für die letzten Jahre in dieser Arbeitsgruppe zu arbeiten und ihr habt entscheidenden Anteil daran getragen.

Abschließend möchte ich einen großen Dank an all meine **Freunde**, welche ich hier leider nicht alle namentlich erwähnen kann, loswerden. Nette Aufheiterungen und Ablenkungen für ein zweifelndes und frustriertes Ego in „düsteren Zeiten“ sind unschätzbar.

Mehr als nur dankbar bin ich meiner **Familie**. Sie waren immer für mich da, auch wenn es (experimentell) mal nicht so rund lief. Sie haben mich unterstützt, wo sie nur konnten, und standen mir immer mit Rat zur Seite. Vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich auf meinem Weg begleitet habt.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift eigenständig und alleinig unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen, Mitteilungen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Berlin, den 15. November 2017

Benjamin Sören Krause